

柑橘全爪螨两个田间种群抗性监测及羧酸酯酶生化特性研究 *

张昆 丁天波 杨爵铭 豆威 王进军 **

(西南大学植物保护学院 昆虫学及害虫控制工程重庆市市级重点实验室 重庆 400716)

摘要 采用叶碟浸渍法测定了重庆北碚和万州地区柑橘全爪螨 *Panonychus citri* (McGregor) 田间种群对阿维菌素、毒死蜱、甲氰菊酯和哒螨灵的抗性水平。结果表明,同室内敏感品系相比,北碚种群对毒死蜱、甲氰菊酯和哒螨灵的相对抗性水平分别达到3倍、3倍和22倍;万州种群对阿维菌素、毒死蜱、甲氰菊酯和哒螨灵的相对抗性水平分别达到2倍、35倍、10倍和2倍。柑橘全爪螨2个地理种群的羧酸酯酶CarE的生化特性研究发现,CarE酶活的增高和毒死蜱的抗性存在一定的相关性。毒死蜱对不同地理种群柑橘全爪螨CarE的抑制效果不同,对抗性倍数较高的万州种群抑制效果最差。

关键词 柑橘全爪螨,抗性监测,羧酸酯酶

Pesticide susceptibility and carboxylesterase activity in two field populations of *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae)

ZHANG Kun DING Tian-Bo YANG Jue-Ming DOU Wei WANG Jin-Jun **

(Key Laboratory of Entomology and Pest Control Engineering, College of Plant Protection,
Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract Samples from two populations of the citrus red mite collected from citrus orchards were assayed for susceptibility to abamectin, chlopyrifos, fenpropothrin and pyridaben. The results indicate that the Beibei population displayed a 3-, 3- and 22-fold resistance ratio, respectively, to chlopyrifos, fenpropothrin and pyridaben compared to a susceptible strain. The Wanzhou population exhibited a 2-, 35-, 10- and 2-fold resistance ratio, respectively, to the same pesticides. Enhancement of CarE activity was involved in resistance to chlopyrifos in both populations. Inhibition of chlopyrifos activity differed between the two mite populations and was stronger in the Wanzhou population than the susceptible strain.

Key words *Panonychus citri*, resistance monitoring, CarE

柑橘全爪螨 *Panonychus citri* (McGregor), 又名柑橘红蜘蛛, 是一种严重为害柑橘的世界性害螨, 在我国主要的柑橘产区危害严重(孟和生和王开运, 2000)。除柑橘外, 其还对苹果、梨、桃、桑、槐、枣、桂花、樱桃、苦楝、蔷薇等其他多种植物产生危害。该害螨使受害部位出现白斑, 严重危害时导致落叶落果, 影响柑橘树的树势和经济产量。

目前, 对橘全爪螨的控制多种方法并举, 但仍然以化学防治为主。因其体小、世代多、繁殖速度

快、发育历期短, 该螨极易对药剂产生抗性。对柑橘全爪螨的抗性进行持续监测, 有助于掌握其抗性的发展规律, 并找到合理的治理方法。到目前为止, 在我国重庆、四川、广东、福建、浙江等地都已相继开展了柑橘全爪螨田间抗性监测。近年来抗性监测结果表明, 柑橘全爪螨不仅对有机磷类、有机氯等传统杀虫杀螨剂产生了抗性, 而且对螺螨酯、联苯肼酯等新型杀螨剂也产生了不同程度的抗性(Hu et al., 2010; Van Leeuwen et al.,

* 资助项目: 公益性行业(农业)科研专项(201103020); 现代柑橘产业技术体系岗位科学家经费项目。

**通讯作者, E-mail: jjwang7008@yahoo.com

收稿日期: 2012-12-06, 接受日期: 2012-12-28

2011)。

昆虫(螨)产生抗性的机制主要是代谢酶(羧酸酯酶(carboxylesterases, CarEs), 细胞色素P450(cytochrome P450 monooxygenases, P450s), 谷胱甘肽S-转移酶(glutathione S-transferase, GSTs))活性增高和作用靶标的敏感性降低。三大代谢酶之一的羧酸酯酶在抗性产生的过程中起了显著的作用。以前的研究已经证实, 蝇螨体内的羧酸酯酶的活性增强是其对联苯菊酯、唑螨酯、螺螨酯、辛硫磷、三唑锡、马拉硫磷、溴氰菊酯等多种杀螨剂产生抗性的原因之一(Rauch and Nauen, 2002; Kim et al., 2004; Van Leeuwen and Tirry, 2007; Baffi et al., 2008; Chen et al., 2009; Ran et al., 2009)。

本研究选用4种不同类型的常用杀螨剂, 对2012年重庆两个主要柑橘产区(万州、北碚)的柑橘全爪螨种群以及实验室饲养的敏感品系进行生物测定, 并对其体内羧酸酯酶生化毒理学特性进行相关研究。旨在明确重庆地区柑橘全爪螨抗性水平, 探索羧酸酯酶在柑橘全爪螨对不同杀螨剂抗性发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 供试螨源

供试柑橘全爪螨均于2012年4—6月间采集。室内敏感品系(SS):采自重庆市北碚区中国柑橘研究所柑橘苗圃园内,后接至西南大学网室内枳壳苗上饲养,期间不接触任何药剂;北碚种群(BB):采自重庆市北碚区中国柑橘研究所柑橘苗圃园;万州种群(WZ):采自重庆市万州区甘宁乡西部农业果园。

1.2 供试药剂

5% 阿维菌素乳油(有效成分:阿维菌素, 深圳诺普信农化股份有限公司);15% 呃螨灵乳油(有效成分: 呃螨灵, 广东中迅农科股份有限公司);40% 毒死蜱乳油(有效成分: 毒死蜱, 四川利尔化学有限公司);99.9% 毒死蜱原药(有效成分: 毒死蜱, Sigma);20% 甲氰菊酯乳油(有效成分: 甲氰菊酯, 浙江威尔达化工有限公司)。

考马斯亮蓝G-250(Fluka);牛血清蛋白(BSA, sigma); α -萘酚(成都市科龙化工试剂厂); α -醋酸萘酯(α NA, 国药集团化学试剂有限公司);毒扁豆碱(Sigma);坚固蓝B盐(生工生物);十二烷基硫酸钠(SDS, Sigma)。

1.3 叶碟浸渍法

本研究中, 抗药性监测采用叶碟浸渍法, 并稍加改进(Hu et al., 2010)。新鲜柠檬叶片采自中国柑橘研究所柠檬园内, 连续数年没有施药。用双蒸水将叶片充分洗净, 晾干, 将叶片剪成直径3 cm的叶碟, 叶碟下依次放置相同大小的滤纸和脱脂棉, 然后一同放入培养皿中, 并加入双蒸水, 水面稍低于叶片。

1.4 试虫(螨)处理

用毛笔挑取25~35头雌成螨至每片叶碟中。待螨在叶碟上固定完毕, 用镊子轻轻夹住叶碟浸入药液(双蒸水)中5 s, 然后用滤纸将残留在叶面及螨体周围的液体吸干。一共设7个浓度梯度, 每个浓度3个重复, 对照用双蒸水处理, 同样重复3次。药剂处理后, 放入光照培养箱中, 温度为(25±1)℃, 相对湿度为75%±5%, 光暗比为14:10。24 h后, 检查死亡率, 用毛笔末端轻碰螨体, 若螨能够行动或足仍能活动则界定为存活, 否则为死亡。

1.5 CarE活性及动力学参数测定

挑取柑橘全爪螨雌成螨200头, 加入磷酸缓冲液(PBS, 0.04 mol·L⁻¹, pH 7.0)2 mL于冰水浴中匀浆。将匀浆液置于4℃, 10 000 g条件下离心15 min, 取上清液, 过滤后收集, 待测。参照Bradford(1976)考马斯亮蓝G-250法, 将50 μL酶液(对照为PBS)与200 μL考马斯亮蓝G-250在酶标仪中25℃条件下反应2 min后, 595 nm下测得其OD值。计算酶液同对照OD值之差, 根据标准曲线计算蛋白质含量(μg·mL⁻¹)。

参照Van Asperen(1962)方法。将75 μL酶液同100 μL α -醋酸萘酯(底物, 3×10⁻⁴ mol·L⁻¹, 其中含1×10⁻⁴ mol·L⁻¹毒扁豆碱)在酶标仪中30℃下保温反应10 min, 加入25 μL显色剂(1%的坚固蓝B盐与5%的十二烷基硫酸钠以2:5体积比均匀混合), 继续在酶标仪中30℃下保温反应10 min, 在600 nm处测定OD值。根据酶液与对照OD值之差, 参照 α -萘酚标准曲线, 得出相应产物量, 再除以酶液中的蛋白含量, 即得羧酸酯酶活力(nmol·min⁻¹·μg⁻¹)。

米氏常数(K_m)和最大反应速度 V_{max} 采用双倒数作图法求得。将底物稀释为不同的浓度梯度,

按上述比活力的测定方法,计算出不同底物浓度下羧酸酯酶比活力,采用双倒数作图法求出 K_m 和 V_{max} 值。

1.6 毒死蜱对 CarE 的体外抑制中浓度 I_{50}

将毒死蜱原药先用丙酮稀释 100 倍,然后用 $0.04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.0 PBS 稀释至合适的浓度,保证反应终体系中丙酮的终浓度不超过 1%,测定每一处理的剩余酶活力,计算抑制率。然后将毒死蜱的终浓度转换成对数值,将抑制率转换成机率值,计算抑制中浓度 I_{50} 。测定方法如下:将 30 μL 酶液和 20 μL 毒死蜱(对照为 PBS)混合在 37°C 条件下 10 min,再加入 125 μL 底物在酶标仪中 30°C 下保温反应 10 min,加入 25 μL 显色剂,继续在酶标仪中 30°C 下保温反应 10 min,在 600 nm 处测定 OD 值,并计算羧酸酯酶比活力。

1.7 数据分析

各杀螨剂抗药性监测数据采用 SPSS 16.0 中的 Probit 模型进行分析,求出毒力回归直线方程和致死中浓度 LC_{50} 值。将各田间种群 LC_{50} 进行比较,得到其相对抗性倍数 RR (resistance ratio)。用 SPSS 16.0 中 Duccan's 多重比较进行酶活性、蛋白含量、 K_m 和 V_{max} 差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 抗药性监测

2012 年重庆地区柑橘全爪螨对 4 种杀螨剂的抗性监测结果见表 1。如表 1 所示,柑橘全爪螨对毒死蜱最不敏感,致死中浓度 LC_{50} 在 21.2 ~ 744.6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间;对阿维菌素和哒螨灵的敏感性较高。4 种杀螨剂的杀螨活性从高到低依次为:阿维菌素 > 哒螨灵 > 甲氰菊酯 > 毒死蜱。

柑橘全爪螨不同地理种群对同一种杀螨剂也表现出不同的抗性水平。同室内敏感品系相比,万州种群对阿维菌素的相对抗性达到 2 倍;北碚种群和万州种群对毒死蜱也分别存在 3 倍和 35 倍的相对抗性;北碚种群和万州种群对甲氰菊酯的相对抗性依次达到了 3 倍和 10 倍;对哒螨灵抗药性监测结果表明,同敏感品系相比,北碚种群和万州种群分别存在 22 倍和 2 倍的抗性。总体看来,柑橘全爪螨对毒死蜱(传统有机磷类)和甲氰菊酯(拟除虫菊酯类)产生了不同程度的抗性,对哒螨灵的抗性水平发展迅速。然而,柑橘全爪螨对生物源杀螨剂阿维菌素的抗性发展还十分缓慢。

表 1 柑橘全爪螨两个地理种群对 4 种杀螨剂的抗药性监测结果(2012)

Table 1 Resistance monitoring results of four acaricides against *Panonychus citri* in 2012

杀螨剂 Acaricide	种群 Population	总数 <i>n</i>	斜率(± SE) Slope(± SE)	LC_{50} [95% 置信限] LC_{50} [95% CI] ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	卡方值 χ^2	相对抗性倍数 Resistance ratio
阿维菌素 Abamectin	室内 SS 室内 SS	347	1.545 ± 0.157	0.029 [0.021; 0.042]	2.022	—
毒死蜱 Chloryrifos	北碚 BB 万州 WZ	451	1.267 ± 0.154	0.026 [0.020; 0.033]	2.893	—
	万州 WZ	430	1.956 ± 0.213	0.041 [0.033; 0.051]	4.311	2
甲氰菊酯 Fenpropothrin	室内 SS 北碚 BB	338	0.402 ± 0.213	21.211 [11.021; 43.045]	0.384	—
哒螨灵 Pyridaben	北碚 BB 万州 WZ	511	1.209 ± 0.182	66.042 [42.480; 88.715]	1.498	3
	万州 WZ	496	1.078 ± 0.118	744.642 [549.249; 1084.001]	3.848	35
甲氰菊酯 Fenpropothrin	室内 SS 北碚 BB	495	1.359 ± 0.189	6.750 [4.941; 8.745]	4.808	—
吡虫啉 Pyridaben	北碚 BB 万州 WZ	580	0.843 ± 0.159	16.667 [11.414; 28.740]	0.394	3
	万州 WZ	553	1.025 ± 0.102	68.129 [48.345; 99.926]	4.031	10
吡虫啉 Pyridaben	室内 SS 北碚 BB	591	1.894 ± 0.271	0.131 [0.106; 0.164]	4.362	—
万州 WZ	北碚 BB 万州 WZ	529	2.439 ± 0.341	2.871 [2.553; 3.327]	1.574	22
	万州 WZ	711	1.249 ± 0.110	0.294 [0.209; 0.396]	2.687	

注:相对抗性倍数 = 田间种群 LC_{50} / 敏感品系 LC_{50} ; χ^2 适合性检验理论值与实测值差异显著符合 ($P > 0.05$)。

Resistance ratio = LC_{50} of field population / LC_{50} of susceptible strain; Chi-squared goodness-of-fit test showed no significant difference between theoretical and observed values ($P > 0.05$)。

2.2 柑橘全爪螨 CarE 生化特性比较

CarE 活力及动力学参数测定结果见表 2。其中,北碚种群的 CarE 总活力最高,其次是万州种群,室内品系 CarE 总活力最低,北碚和万州种群的 CarE 总活力显著高于敏感品系,而两个地理种群之间的总活力无显著差异;北碚种群 CarE 比活

力最高,而万州种群的比活力最低,并且显著低于敏感品系和北碚种群;北碚和万州种群的米氏常数 K_m 显著高于敏感品系;北碚种群的最大反应速度 V_{max} 显著高于万州种群和敏感品系,而万州种群和敏感品系之间 V_{max} 无显著性差异。

表 2 柑橘全爪螨 2 个地理种群与室内敏感品系 CarE 生化特性比较

Table 2 Comparison of the biochemical characteristics of CarE between field populations and susceptible strain of *Panonychus citri*

种群 Population	蛋白浓度 Protein ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	CarEs 活性 CarEs activity			米氏常数 K_m ($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$)	最大反应速度 V_{max} ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1}$)
		总活力 Total activity ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1}$)	比活力 Specific activity			
			($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$)			
室内 SS	10.56 ± 0.75a	2.93 ± 0.26a	4.62 ± 0.29b	24.88 ± 1.33a	4.75 ± 0.35a	
北碚 BB	14.07 ± 0.47b	3.35 ± 0.03b	4.77 ± 0.14b	31.91 ± 3.81b	5.54 ± 0.12b	
万州 WZ	17.04 ± 0.85c	3.44 ± 0.03b	4.03 ± 0.17a	31.57 ± 1.74b	3.57 ± 0.24a	

注:同一列数据后标有不同字母代表存在显著性差异(Duncan 多重比较, $P < 0.05$)。

Data followed by different letters in the same column indicate significantly different at 0.05 level by Duncan's multiple range test.

2.3 毒死蜱对 CarE 的体外抑制作用

毒死蜱对 CarE 的抑制中浓度见图 1。从图 1 中可以看出毒死蜱对北碚种群 CarE 抑制作用最

强,其次是敏感品系和万州种群,其中万州种群 CarE 抑制中浓度 I_{50} 显著高于室内敏感品系的 I_{50} ,而北碚种群与敏感品系 I_{50} 无差异。

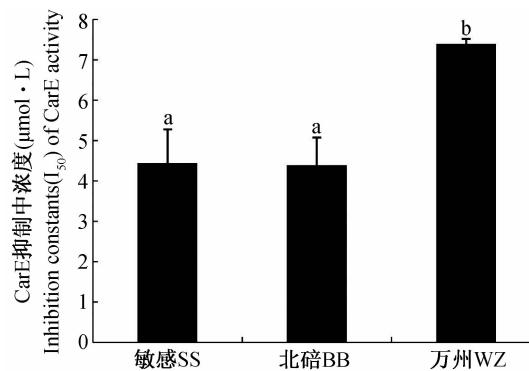


图 1 毒死蜱对不同地理种群柑橘全爪螨 CarE 的抑制中浓度 I_{50}

Fig. 1 Inhibition constants (I_{50}) of chlopyrifos against CarE from different populations of *Panonychus citri*

柱上标有不同字母表示差异显著(Duncan 多重比较, $P < 0.05$)。

Histograms with different letters indicate significantly different at 0.05 level by Duncan's multiple range test.

3 讨论

本研究采用叶碟浸渍法,在测定了柑橘全爪螨室内敏感品系的抗药性水平基础上,对柑橘全

爪螨北碚和万州种群对阿维菌素、毒死蜱、甲氰菊酯和哒螨灵 4 种不同类型的杀螨剂进行抗性监测。其中柑橘全爪螨对阿维菌素的抗性发展十分缓慢,两个地理种群与敏感品系间无差异,北碚种

群的阿维菌素抗药性监测结果与 2009 年的监测结果十分接近(刘永华等, 2010)。也从侧面反映了抗性发展缓慢是在我国注册时间超过 10 年的阿维菌素仍优先被选择用于柑橘全爪螨田间化学防治的主要原因之一。哒螨灵的监测结果发现, 北碚种群和来源相同的室内敏感品系之间已有 22 倍的抗性, 发展十分迅速, 前人的研究也证实了哒螨灵在田间的敏感性下降迅速(孟和生和王开运, 2000; Niu et al., 2011)。从抗性综合治理的角度考虑, 哒螨灵不适合作为一种田间连续使用的药剂来进行柑橘全爪螨的防治。毒死蜱和甲氰菊酯作为传统的杀螨剂, 无论是北碚种群还是万州种群都对二者产生了不同程度的抗性。其中, 万州种群对上述两种杀螨剂的相对抗性分别是 10 倍和 35 倍, 这可能与当地对传统杀螨剂的长期不合理使用有很大关系。因此, 在柑橘全爪螨防治过程中避免单一化学农药的连续使用, 注意不同类型杀螨剂的混合使用和轮换使用是延缓抗性发展的必要措施。

毒死蜱作为传统有机磷类杀虫(螨)剂的代表, 在化学防治上已经使用了很多年, 极易在昆虫(螨)体内产生抗性(曾东强等, 2008; 王利华等, 2011)。昆虫(螨)对其形成抗性过程中会相继地引起代谢酶(CarE 在内)的活性变化以及靶标酶(乙酰胆碱酯酶(AchE)在内)的结构变化。在此基础上, 本研究设计了柑橘全爪螨不同地理种群的 CarE 生化毒理学特性的比较分析。其中, 万州种群 CarE 比活力低于敏感品系, 同时, 敏感品系 CarE 的米氏常数显著小于万州种群, 说明敏感品系 CarE 与底物的亲和性强于万州种群。但万州种群 CarE 总活力显著高于室内敏感品系, 说明万州种群整体酶活高于室内敏感品系, 离体抑制研究发现, 毒死蜱对相对抗性最高的万州种群抑制效果最差, 说明柑橘全爪螨万州种群在经过外界抗性筛选后, 体内 CarE 可能发生改变, 对该种杀螨剂不敏感, 同样的结果在前人的研究中也有发现(李腾武等, 1998)。而对于柑橘全爪螨 CarE 同抗药性关系的研究也不仅仅局限于生化毒理学方面, 进一步通过分子生物学、蛋白组学深入研究其作用机理将是我们下一步的工作重点。

- Baffi MA, de Souza GRL, de Sousa CS, Ceron CR, Bonetti AM, 2008. Esterase enzymes involved in pyrethroid and organophosphate resistance in a Brazilian population of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari, Ixodidae). *Mol. Biochem. Parasit.*, 160(1):70–73.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72(1):248–254.
- Chen ZY, Ran C, Zhang L, Dou W, Wang JJ, 2009. Susceptibility and esterase activity in citrus red mite *Panonychus citri* (McGregor) (Acari:Tetranychidae) after selection with phoxim. *Int. J. Acarol.*, 35(1):33–40.
- Hu J, Wang C, Wang J, You Y, Chen F, 2010. Monitoring of resistance to spirodiclofen and five other acaricides in *Panonychus citri* collected from Chinese citrus orchards. *Pest Manag. Sci.*, 66(9):1025–1030.
- Kim YJ, Lee SH, Lee SW, Ahn YJ, 2004. Fenpyroximate resistance in *Tetranychus urticae* (Acari:Tetranychidae): cross-resistance and biochemical resistance mechanisms. *Pest Manag. Sci.*, 60(10):1001–1006.
- Niu JZ, Liu GY, Dou W, Wang JJ, 2011. Susceptibility and activity of glutathione S-transferases in nine field populations of *Panonychus citri* (Acari:Tetranychidae) to pyridaben and azocyclotin. *Fla. Entomol.*, 94(2):321–329.
- Ran C, Chen Y, Wang JJ, 2009. Susceptibility and carboxylesterase activity of five field populations of *Panonychus citri* (McGregor) (Acari:Tetranychidae) to four acaricides. *Int. J. Acarol.*, 35(2):115–121.
- Rauch N, Nauen R, 2002. Spirodiclofen resistance risk assessment in *Tetranychus urticae* (Acari:Tetranychidae): a biochemical approach. *Pestic. Biochem. Phys.*, 74(2):91–101.
- Van Asperen K, 1962. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *J. Insect Physiol.*, 8(4):401–416.
- Van Leeuwen T, Tirry L, 2007. Esterase-mediated bifenthrin resistance in a multiresistant strain of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Pest Manag. Sci.*, 63(2):150–156.
- Van Leeuwen T, Van Nieuwenhuyse P, Vanholme B, Dermauw W, Nauen R, Tirry L, 2011. Parallel evolution of cytochrome b mediated bifenazate resistance in the citrus red mite *Panonychus citri*. *Insect Mol. Biol.*, 20(1):135–140.

李腾武, 高希武, 郑炳宗, 朱树勋, 司升云, 1998. 不同地区小菜蛾种群羧酸酯酶的毒理学性质研究. 昆虫学报,

- 41(S1):28-35.
刘永华,蒋红波,袁明龙,樊钰虎,杨丽红,陈静,王进军,2010.柑橘全爪螨对4种杀螨剂的抗性监测及增效作用.果树学报,27(4):570-574.
孟和生,王开运,2000.桔全爪螨对哒螨灵抗性的选育及其生化机理.农药学学报,2(3):30-34.

- 王利华,张月亮,郭慧芳,方继朝,2011.毒死蜱对灰飞虱抗性和敏感种群的亚致死效应比较.中国水稻科学,(5):529-534.
曾东强,高华,李晶晶,徐汉虹,2008.甘蓝薄翅螟对毒死蜱的抗性风险评估及解毒酶活性研究.华南农业大学学报,(4):38-41.

* * * * *

封面介绍

二斑叶螨 *Tetranychus urticae* Koch

二斑叶螨 *Tetranychus urticae* Koch 广泛分布于世界各地,是果树、蔬菜、花卉等农作物上的重要害螨,主要在寄主叶片背面取食和繁殖,被害叶片初期沿叶脉附近出现许多细小失绿斑驳,随着害螨数量增加,叶背面逐渐变褐色,叶面呈苍灰绿色,变硬变脆,被害严重时造成大量落叶。二斑叶螨在我国北京、河北、山东、辽宁、河南、陕西、山西、江苏、安徽、福建、甘肃等地均有报道。二斑叶螨因寄主范围广、繁殖速度快、抗药性高、隐蔽性强,成为世界范围内农业生产上的一个重要问题。封面照片为二斑叶螨绿色型成螨在叶片取食时的状态。

(南京农业大学昆虫学系 洪晓月)