

亚致死质量浓度联苯肼酯对截形叶螨解毒酶系的影响*

尚素琴** 薛玉丽

(甘肃农业大学植物保护学院, 甘肃省农作物病虫害生物防治工程实验室, 兰州 730070)

摘要 【目的】明确联苯肼酯的亚致死质量浓度对截形叶螨 *Tetranychus truncatus* 解毒酶系的影响, 从而为进一步揭示截形叶螨的代谢抗性及联苯肼酯的科学使用提供理论依据和指导。【方法】采用叶片浸渍法测定了联苯肼酯对截形叶螨雌成螨的 LC_{50} , 应用毒力回归方程计算截形叶螨雌成螨死亡率为 10% 和 30% 时联苯肼酯的亚致死质量浓度 LC_{10} 和 LC_{30} , 并处理截形叶螨雌成螨, 以甲醇水溶液作为对照, 测定并分析其体内羧酸酯酶 (CarE)、谷胱甘肽 *S*-转移酶 (GSTs)、多功能氧化酶 (MFO) 的比活力及酶动力学常数 (米氏常数 K_m 和最大反应速率 V_{max}) 的变化。【结果】比活力与对照相比, LC_{10} 、 LC_{30} 处理后, 截形叶螨雌成螨体内 CarE、GSTs 和 MFO 的比活力均显著升高 ($P < 0.05$), 且 LC_{30} 处理组 CarE、GSTs (除 24 h 外) 比活力显著高于 LC_{10} ($P < 0.05$)。酶动力学常数: 体内 CarE 的 K_m 显著减小或无明显变化 ($P < 0.05$), V_{max} 显著增大 ($P < 0.05$), 即 CarE 与底物亲和力增大, 反应速率加快; 而 GSTs 和 MFO 的 K_m 显著增大或无明显变化 ($P < 0.05$), V_{max} 均显著减小 ($P < 0.05$), 说明 GSTs 和 MFO 与底物亲和力低, 反应速率降低。【结论】联苯肼酯对截形叶螨雌成螨体内的解毒酶系有诱导作用, CarE 在截形叶螨对该杀螨剂的代谢中起主导作用。

关键词 截形叶螨; 联苯肼酯; 致死中浓度 LC_{50} ; 解毒酶; 比活力; 酶动力学常数

Effect of sublethal concentrations of bifenthrin on detoxifying enzymes in *Tetranychus truncatus*

SHANG Su-Qin** XUE Yu-Li

(College of Plant of Gansu Agricultural University, Biological Engineering Laboratory of Crop Diseases and Pests of Gansu Province, Lanzhou 730070, China)

Abstract [Objectives] To determine the effect of sublethal concentrations of bifenthrin on detoxifying enzymes in *Tetranychus truncatus*, further understanding of the mechanism underlying resistance to bifenthrin in this species and improve the application of bifenthrin. [Methods] The LC_{50} of bifenthrin to adult female *T. truncatus* was tested using the leaf-dipping method and sublethal concentrations corresponding to 10% and 30% mortality (LC_{10} and LC_{30}) calculated from the virulence regression equation. The specific activity, and two constants of kinetic parameters, Michaelis constant (K_m) and Maximal velocity (V_{max}), of carboxylesterase (CarE), glutathione *s*-transferase (GSTs) and multifunctional oxidase (MFO), were tested and analyzed after treating *T. truncatus* with LC_{10} and LC_{30} doses of bifenthrin. [Results] Specific activities of CarE, GSTs and MFO were all significantly increased ($P < 0.05$) by exposure to LC_{10} and LC_{30} doses of bifenthrin. The specific activities of CarE and GSTs in the LC_{30} treatment group were generally significantly higher than those of the LC_{10} treatment group ($P < 0.05$). The K_m value of CarE either decreased significantly, or had no significant change ($P < 0.05$), whereas that of GSTs and MFO increased significantly, or had no significant change ($P < 0.05$). The V_{max} value of CarE increased significantly ($P < 0.05$), indicating that CarE has a high substrate affinity and catalytic rate. Conversely, the V_{max} value of GSTs and MFO decreased significantly ($P < 0.05$), indicating low substrate affinity. [Conclusion] Bifenthrin can induce the activity of

*资助项目 Supported projects: 甘肃农业大学青年导师基金 (GAU-QNDS-201606)

**通讯作者 Corresponding author, E-mail: Shangsq@gsau.edu.cn

收稿日期 Received: 2019-04-26; 接受日期 Accepted: 2019-06-12

detoxification enzymes in *T. truncatus* and CarE plays a key role in the detoxification of bifenaazate in this species.

Key words *Tetranychus truncatus*; bifenaazate; lethal concentration; detoxifying enzymes; specific activity; kinetic parameters of enzymology

截形叶螨 *Tetranychus truncatus* 属节肢动物门 (Arthropoda) 蛛形纲 (Arachnida) 绒螨目 (Trombidiformes) 叶螨科 (Tetranychidae), 是一种世界性的重要农业害虫, 寄主众多 (刘珩等, 2013; 崔玉楠, 2014)。主要刺吸植物叶片、枝梢、芽等 (郭长翠, 2007)。由于体小、适应能力强, 繁殖速度快、短期内易爆发, 抗药性强、不易控制, 危害较隐蔽等特点, 给截形叶螨的防治造成极大困难 (王建伟, 2007; 张传燕等, 2015)。

目前, 化学防治仍是我国防治害螨的主要手段, 但长期使用农药易使害螨产生抗药性, 降低杀螨剂的防治效果 (王玲等, 2016)。究其原因, 代谢抗性是螨类产生抗性的重要机制之一, 发挥解毒代谢作用的主要有羧酸酯酶 (Carboxylesterase, CarE)、谷胱甘肽 *S*-转移酶 (Glutathiones-transferases, GSTs) 和多功能氧化酶 (Multifunctional oxidase, MFO) 三大解毒酶系 (高萍等, 2012)。CarE 能与进入螨体内的杀螨剂迅速结合并将其降解, 使杀螨剂失去原有作用; GSTs 能与杀螨剂中具有毒理作用的亲电基团结合并排出体外; MFO 负责各类氧化代谢作用, 参与多种杀螨剂的代谢分解 (何林等, 2003; 卢文才, 2017)。害螨对杀螨剂产生抗性与其体内解毒酶活性增强有关。如赵卫东等 (2003) 发现二斑叶螨对阿维菌素的抗性与 MFO 和 GSTs 的活性提高有关, 对哒螨灵的抗性与 MFO、CarE 的活性增强有关, 对甲氰菊酯的抗性与 CarE、MFO 和 GSTs 活性的增强有关。高新菊和沈慧敏 (2011) 报道了二斑叶螨体内 MFO 活性的上升是其对甲氰菊酯产生抗性的主要原因。

联苯腈酯 (Bifenazate) 是一种新型杀螨剂, 属于联苯腈类杀螨剂, 具有毒性低, 作用迅速 (48-72 h), 持效期长 (约为 14 d 左右), 对环境友好, 与现有商业化的杀螨剂无交互抗性, 对

植食性螨均有效, 而对寄生蜂、捕食螨、草蛉等风险低等特点, 非常适合于害虫螨的综合防治, 是目前用于防治叶螨最有效的药剂之一 (Van *et al.*, 2011; 王元元等, 2011; 徐淑等, 2014)。目前, 尚未见联苯腈酯对截形叶螨解毒酶系影响的报道。

本试验用联苯腈酯亚致死质量浓度处理截形叶螨, 测定其体内解毒酶系的比活力、米氏常数 (Michaelis constants, K_m) 和最大反应速率 (Maximal velocities, V_{max}) 随时间的变化情况, 以期探究亚致死质量浓度的联苯腈酯对截形叶螨体内解毒酶比活力及酶动力常数的影响, 为截形叶螨的抗药性治理及联苯腈酯的合理使用提供依据和指导。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

截形叶螨敏感种群 (SS): 甘肃农业大学养虫室内用新鲜豇豆苗饲养。

1.2 饲养条件

本试验用螨均置于温度 (25 ± 1) °C, RH (60 ± 5) %, 光周期 L:D=16:8 培养箱饲养。

饲养期间不接触任何杀螨剂。选用龄期基本一致的雌成螨供本试验使用。

1.3 供试药剂和仪器

1.3.1 供试药剂及试剂 联苯腈酯 (Bifenazate) 原药 ($\geq 99\%$), 成都德思特生物科技有限公司; 牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA), Solarbio; 考马斯亮蓝 G-250, Solarbio; 固蓝 B 盐 (分析纯), 上海源叶生物科技有限公司; 十二烷基磺酸钠 (Sodium laurylsulfonate, SDS, 化学纯), 上海中秦化学试剂有限公司; α -萘酚 (α -naphthol, $\geq 99\%$), Solarbio; α -乙酸萘酚 (α -naphthyl acetate, 化学纯), Solarbio; 毒扁

豆碱,甘肃金博研生物科技有限公司;乙二胺四乙酸(Ethylene diaminetetra acetic acid, EDTA, $\geq 99.5\%$),天津市光复科技发展有限公司;还原性谷胱甘肽(L-glutathione, GSH), Solarbio; 1-氯-2,4-二硝基苯(1-chloro-2,4-dinitrobenzene, CDNB), $\geq 99\%$,化学纯),上海中秦化学试剂有限公司;对硝基苯酚($\geq 99.5\%$),天津市凯信化学工业有限公司;对硝基苯甲醚(4-Nitroanisole, 98%),阿拉丁;还原型辅酶(Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH, $>98\%$), Solarbio。

1.3.2 主要仪器 高速冰冻离心机 H1850R (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)、电子天平 AR224CN (上海奥豪斯仪器有限公司)、电热恒温水浴锅 S·HH·W21·420S (上海跃进医疗器械有限公司)和优普系列超纯水器 UPD-I-20T (四川优普超纯科技有限公司)和酶标仪 ELX800UV (Bio-Tek Instruments)。

1.4 试验方法

1.4.1 联苯胼酯对截形叶螨的室内毒力测定 采用叶片浸渍法(黄素青等, 2005; 雍小菊等, 2011): 选用直径 9.0 cm, 高 1.0 cm 的培养皿做饲养台, 将海绵、滤纸、新鲜豇豆叶(叶背朝上)依次由下至上放置, 海绵加水至饱和, 并用脱脂棉包裹叶片边缘和叶柄。每饲养台挑取 30 头左右大小一致, 行动活泼的雌成螨, 置于养虫室中 30-60 min 后, 在解剖镜下剔除死亡或不活泼的个体, 记录实际螨头数作为供试基数。

将供试药剂稀释成 6 个浓度梯度(1、2、4、8、16、32 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 并采用相同配比的甲醇水溶液作为对照。将带有雌成螨的叶片浸入各药剂中, 轻轻摇动 5 s 后取出, 用吸水纸迅速吸干螨体及其周围多余的药液, 叶片重新放于培养皿中, 用吸水脱脂棉围好。放置培养箱 48 h 后, 记录螨的死亡数, 用毛笔尖轻触螨体, 肢体不动者视为死亡。每个浓度重复 3 次。然后计算校正死亡率, 拟合毒力回归方程, 最终获得亚致死质量浓度 LC_{10} 和 LC_{30} 。

1.4.2 亚致死质量浓度处理 配制联苯胼酯的

亚致死质量浓度 LC_{10} 和 LC_{30} 药剂 1 500 mL, 连同螨和豇豆苗浸渍, 使充分接触药液, 摆动 5 s 取出, 置于人工培养箱。分别在浸药 2、4、6、12、24、36、48、60、72 h 时挑取 150 头雌成螨于 1.5 mL 离心管, 置于 -80°C 保存备用。另以相同配比的甲醇水处理作为对照。每个处理在每个时间点重复 3 次。

1.4.3 酶源蛋白制备 将上述收集的螨分别用 1.5 mL 冷冻的 $0.04 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH7.0) PBS 缓冲液、 $66 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH7.0) PBS 缓冲液、 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH7.8) PBS 缓冲液匀浆, 4°C 10 000 g 离心 15 min, 取上清液得到 CarE、GSTs、MFO 酶液, 4°C 保存备用。

1.4.4 酶源蛋白含量测定 采用 Bradford (1976)考马斯亮蓝 G-250 法。依次分别在酶标板待测孔中加入考马斯亮蓝 G-250 试剂 200 μL , 酶液 50 μL , 对照用 50 μL 缓冲液替代酶液。37 $^\circ\text{C}$ 反应 10 min, 在 595 nm 下测定其 OD 值。试验重复 3 次。根据标准曲线方程, 将所测 OD 值与对照 OD 值之差代入计算, 得出相对应的蛋白含量。

1.4.5 羧酸酯酶(CarE)比活力测定 参照何恒果(2010)方法, 略有改动。以 α -乙酸萘酯($3 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 含毒扁豆碱)为底物, 经酯酶在 30°C 下水解反应 10 min 后, 加入 25 μL 显色剂(1%固兰 B 水溶液: 5%十二烷基磺酸钠=2:5), 用酶标仪于 600 nm 处测 OD 值。根据 α -萘酚标准曲线和酶源蛋白含量, 将 OD 值换算成酶比活力($\mu\text{mol}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)。

1.4.6 谷胱甘肽 S-转移酶(GSTs)比活力测定 参照何恒果(2010), Clark 等(2001)方法。37 $^\circ\text{C}$ 条件下, 以 1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)为底物经 GSTs 作用, 与还原性谷胱甘肽(GSH)反应, 用酶标仪在 340 nm 处, 以 30 s 为间隔测定 5 min 内其 OD 值, 参照 Habig 等(1974)并计算 GSTs 比活力($\mu\text{mol}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)。

酶活力依照以下公式计算:

$$\text{GSTs 活力单位}(\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1})=(\Delta\text{OD}_{340}\cdot v) / (\varepsilon\cdot L)$$

式中 ΔOD_{340} 为吸光度每分钟的变化值

($\Delta OD_{340}/\text{min}$) v 为酶促反应体系、 ϵ 为产物的消光系数 [$0.0096 \text{ L}/(\mu\text{mol}\cdot\text{cm})$], L 为光程 (1 cm)。

GSTs 比活力 ($\mu\text{mol}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) = 酶活力单位/酶液蛋白含量。

1.4.7 多功能氧化酶 (MFO) 比活力测定 参照 Kim 等 (2006) 何恒果 (2010) 方法。以对硝基苯甲醚为底物, 氧和 NADPH 作电子供体, 37°C 水浴反应 30 min, MFO 催化发生氧脱甲基作用生成对硝基苯酚, 用盐酸 ($1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 终止反应。然后用氯仿、NaOH 溶液 ($0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 萃取, 用酶标仪在 400 nm 处测 OD 值。根据对硝基苯酚标准曲线和酶源蛋白含量, 将 OD 值换算成酶比活力 $\mu\text{mol}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

1.4.8 酶动力常数的测定 参照 Wilkinson (1961) 方法, 将底物分别稀释成不同浓度梯度, 采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法计算米氏常数 (K_m) 和最大反应速率 (V_{max})。

1.5 数据处理

校正死亡率采用以下公式进行:

校正死亡率 (%) = $[(\text{处理组死亡率}-\text{对照组死亡率}) / (1-\text{对照组死亡率})] \times 100$ 。

数据用 Excel 2013 和 SPASS 24.0 处理, 采用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 联苯肼酯对截形叶螨的毒力

根据生测结果, 以联苯肼酯不同质量浓度的常用对数为自变量 (X), 以死亡率几率值为因变量 (Y), 建立毒力回归方程: $Y = -1.64 + 2.30X$, 相关系数 $R^2 = 0.990$, 卡方值 $\chi^2 = 1.825$, 显著性 $P = 0.609$ 。据此计算出亚致死浓度 $LC_{10} = 2.566 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (95% 置信区间: $1.722-3.358 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), $LC_{30} = 4.484 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (95% 置信区间: $3.443-5.417 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。

2.2 解毒酶比活力

2.2.1 羧酸酯酶 (CarE) 比活力 如图 1 知, 与对照相比, 亚致死质量浓度 LC_{10} 、 LC_{30} 处理

截形叶螨后, 其体内 CarE 比活力在 2-72 h 的 9 个处理时间点均显著升高 ($P < 0.05$), 且 LC_{30} 处理下 CarE 比活力均显著高于 LC_{10} ($P < 0.05$)。 LC_{30} 处理组 CarE 比活力呈先升高后趋于稳定再降低的趋势, 处理后 6 h 达最大, 持续至 48 h, 随后逐渐降低; LC_{10} 处理组 CarE 比活力在 4 h 以前保持不变, 随后出现波动, 在 6 h 和 36 h 最大, 36 h 后逐渐降低; 对照组 CarE 比活力峰值出现在 6 h 和 24 h。

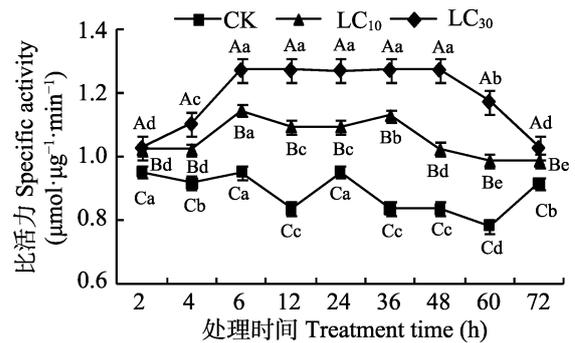


图 1 亚致死质量浓度联苯肼酯对截形叶螨 CarE 比活力的影响

Fig. 1 Effect of sublethal concentrations of bifenthrin on specific activity of CarE in *Tetranychus truncatus*

图中不同小写字母表示同一处理下不同时间解毒酶比活力差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示同一时间不同处理下解毒酶比活力差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

Date with the different lowercase letters in the figure indicate the significant difference of detoxifying enzymes specific activity in the different time under the same treatment ($P < 0.05$), while with the different capital letters indicate the significant difference of detoxifying enzymes specific activity under the different treatments in the same time ($P < 0.05$). The same below.

2.2.2 谷胱甘肽 S-转移酶 (GSTs) 比活力 亚致死质量浓度 LC_{10} 、 LC_{30} 对截形叶螨体内 GSTs 比活力的影响如图 2 所示。 LC_{10} 、 LC_{30} 处理雌成螨后, 其体内 GSTs 的比活力在 2-72 h 的 9 个时间点均显著高于对照 ($P < 0.05$), 在 6 h 时达最大, 与对照一致。在 2-12 h 时 LC_{10} 、 LC_{30} 处理的变化趋势与对照一致, 即先升高后降低, 且 LC_{30} 显著高于 LC_{10} ($P < 0.05$); 在 24 h 以后 LC_{10} 、 LC_{30} 处理的变化趋势与对照存在差异, LC_{30} 处理组呈现先升高后降低的趋势, 而在 24-36 h 时 LC_{10} 处理 GSTs 的比活力下降, 随后的变化趋势与 LC_{30} 基

本一致,在 24 h 时 LC_{10} 显著高于 LC_{30} ($P < 0.05$), 随后其他时间点 LC_{30} 均显著高于 LC_{10} ($P < 0.05$)。

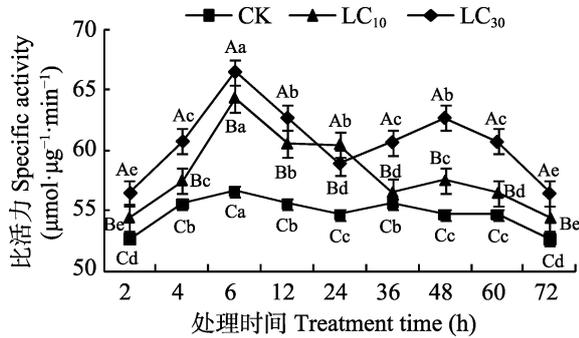


图 2 亚致死质量浓度联苯腈酯对截形叶螨 GSTs 比活力的影响

Fig. 2 Effect of sublethal concentrations of bifenthrin on specific activity of GSTs in *Tetranychus truncatus*

2.2.3 多功能氧化酶 (MFO) 比活力 由图 3 可知,亚致死质量浓度 LC_{10} 、 LC_{30} 处理截形叶螨后,其体内 MFO 比活力在 2-72 h 的 9 个时间点均显著高于对照 ($P < 0.05$);在 2-6 h 时 LC_{10} 和 LC_{30} 处理均先迅速升高,随后降低,与对照一致;6 h 后与对照存在差异, LC_{30} 处理继续下降,随后升高,再持续下降, LC_{10} 呈先升高后降低的趋势; LC_{10} 与 LC_{30} 相比,除在 12 h、36-60 h 时 LC_{10} 显著高于 LC_{30} 外 ($P < 0.05$),其他时间点 LC_{30} 均显著高于 LC_{10} ($P < 0.05$)。

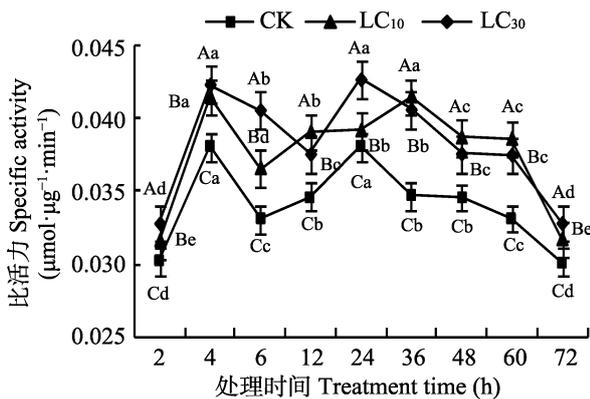


图 3 亚致死质量浓度联苯腈酯对截形叶螨 MFO 比活力的影响

Fig. 3 Effect of sublethal concentrations of bifenthrin on specific activity of MFO in *Tetranychus truncatus*

2.3 解毒酶动力学常数

2.3.1 羧酸酯酶 (CarE) 动力学常数

亚致死质量浓度 LC_{10} 、 LC_{30} 处理截形叶螨雌成螨后, CarE 的动力学常数 K_m 和 V_{max} 如表 1 所示。从表 1 可以看出,与对照相比, LC_{10} 、 LC_{30} 处理在 2、6、24、72 h 时 CarE 的 K_m 均显著减小 ($P < 0.05$),在 60 h 时 LC_{10} 的 K_m 显著减小 ($P < 0.05$),其他时间无显著差异; LC_{10} 与 LC_{30} 处理相比,2 h 时 LC_{10} 处理显著高于 LC_{30} ,在 60 h 时 LC_{30} 处理显著高于 LC_{10} ($P < 0.05$),其他时间无显著差异; LC_{10} 在 6-36 h 无显著差异 ($P < 0.05$), LC_{30} 处理在 6-48 h 无显著差异 ($P < 0.05$)。 LC_{10} 、 LC_{30} 处理 CarE 的 V_{max} 均显著高于对照 ($P < 0.05$);

2.3.2 谷胱甘肽 S-转移酶 (GSTs) 动力学常数 亚致死质量浓度 LC_{10} 、 LC_{30} 处理截形叶螨雌成螨后,GSTs 的动力学常数 K_m 和 V_{max} 如表 2 所示。

从表 2 可以看出,在 6-24 h、48 h 时, LC_{10} 处理 GSTs 的 K_m 均显著高于对照 ($P < 0.05$),其他时间无显著性差异;除在 24 h 和 72 h 时 LC_{30} 处理与对照差异不显著外,其他时间 LC_{30} 处理均显著高于对照 ($P < 0.05$);除 6 h、72 h 时, LC_{10} 与 LC_{30} 差异不显著,24 h LC_{10} 高于 LC_{30} 外,其他时间 LC_{30} 均显著高于 LC_{10} ($P < 0.05$);与对照相比, LC_{10} 、 LC_{30} 处理 GSTs 的 V_{max} 均显著减小 ($P < 0.05$);2、12、72 h 时 LC_{10} 、 LC_{30} 处理无显著差异,24 h 时 LC_{30} 显著高于 LC_{10} ,其他时间 LC_{10} 显著高于 LC_{30} ($P < 0.05$)。

2.3.3 多功能氧化酶 (MFO) 动力学常数 亚致死质量浓度 LC_{10} 、 LC_{30} 处理截形叶螨雌成螨后,MFO 的动力学常数 K_m 和 V_{max} 如表 3 所示。与对照相比, K_m 除 24 h 时 LC_{10} 处理无明显变化,12 h 时 LC_{30} 无明显变化外,其余时间点均显著增大 ($P < 0.05$);在 6、24、72 h 时, LC_{30} 处理显著高于 LC_{10} ,在 12 和 48 h 时 LC_{10} 显著高于 LC_{30} ($P < 0.05$),其他时间无显著差异;与对照相比, V_{max} 除 4、6、24 h 时 LC_{10} 处理无明显变化,4 h 和 24 h 时 LC_{30} 无明显变化外,其他时间点 LC_{10} 、 LC_{30} 均显著减小 ($P < 0.05$);除 6 h 时 LC_{10} 显著高于 LC_{30} 外, LC_{10} 与 LC_{30} 无显著差异。

表 1 联苯肼酯亚致死质量浓度处理截形叶螨后不同时间 CarE 的动力学常数

Table 1 The kinetic parameters of CarE in *Tetranychus truncatus* treated with sublethal concentration of bifenthrin

时间 (h)	米氏常数 K_m ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)			最大反应速率 V_{\max} ($\mu\text{mol}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)		
	对照 CK	LC ₁₀	LC ₃₀	对照 CK	LC ₁₀	LC ₃₀
2	0.295±0.004Aa	0.269±0.005Bab	0.254±0.003Ccd	2.833±0.046Cd	3.322±0.012Bab	3.436±0.009Aab
4	0.276±0.003Ab	0.270±0.011Aab	0.259±0.002Abc	2.933±0.025Cc	3.289±0.023Bbc	3.367±0.009Ac
6	0.293±0.005Aa	0.280±0.004ABa	0.274±0.003Ba	2.849±0.021Cd	3.049±0.004Be	3.185±0.016Ae
12	0.266±0.004Abc	0.276±0.004Aa	0.272±0.004Aa	3.021±0.033Bb	3.106±0.005ABde	3.195±0.034Ae
24	0.292±0.003Aa	0.280±0.004Ba	0.274±0.002Ba	2.833±0.017Cd	3.115±0.006Bde	3.226±0.022Ade
36	0.268±0.003Abc	0.274±0.005Aa	0.270±0.004Aa	3.012±0.012Cbc	3.145±0.048Bd	3.257±0.023Ad
48	0.273±0.005Ab	0.269±0.001Aab	0.272±0.003Aa	3.003±0.010Bbc	3.247±0.007Ac	3.279±0.020Ad
60	0.259±0.001Ac	0.252±0.003Bc	0.265±0.001Aab	3.155±0.020Ba	3.356±0.025Aab	3.401±0.012Abc
72	0.271±0.003Ab	0.257±0.003Bbc	0.247±0.005Bd	2.941±0.016Cc	3.378±0.022Ba	3.484±0.007Aa

表中数据为平均值±标准误,不同小写字母表示同一处理下不同时间酶动力学常数差异显著 ($P<0.05$),不同大写字母表示同一时间不同处理下酶动力学常数差异显著 ($P<0.05$)。表 2、表 3 同。

Data in the table are mean±SE, and followed by the different lowercase letters indicate the significant difference of kinetic parameters in the different time under the same treatment ($P<0.05$), while followed by the different capital letters indicate the significant difference of kinetic parameters under the different treatments in the same time ($P<0.05$). The same as table 2 and table 3.

表 2 联苯肼酯亚致死质量浓度处理截形叶螨后不同时间 GSTs 的动力学常数

Table 2 The kinetic parameters of GSTs in *Tetranychus truncatus* treated with sublethal concentration of bifenthrin

时间 (h)	米氏常数 K_m ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)			最大反应速率 V_{\max} ($\mu\text{mol}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)		
	对照 CK	LC ₁₀	LC ₃₀	对照 CK	LC ₁₀	LC ₃₀
2	3.525±0.047Bd	3.654±0.103ABd	3.871±0.054Ae	63.291±0.052Aa	61.728±0.487Ba	61.350±0.344Ba
4	3.880±0.019Bb	3.971±0.053Bc	4.249±0.039Acd	59.880±0.148Ac	58.480±0.406Bc	56.497±0.210Ccd
6	4.040±0.066Ba	4.661±0.123Aa	4.953±0.207Aa	57.143±0.279Ad	53.763±0.290Be	51.813±0.203Cf
12	3.851±0.021Cb	4.322±0.102Bb	4.659±0.123Aab	59.524±0.348Ac	56.497±0.116Bd	55.866±0.166Bde
24	3.773±0.031Bbc	4.270±0.067Ab	3.947±0.049Bde	61.350±0.506Ab	56.180±0.157Cd	58.824±0.192Bb
36	3.850±0.021Bb	3.882±0.018Bcd	4.225±0.032Acd	59.880±0.122Ac	59.172±0.257Bbc	56.180±0.096Cde
48	3.710±0.027Cc	3.929±0.035Bc	4.606±0.036Ab	61.728±0.137Ab	58.824±0.309Bbc	55.556±0.160Ce
60	3.675±0.023Bc	3.845±0.015Bcd	4.278±0.097Ac	61.350±0.079Ab	59.524±0.133Bb	56.818±0.093Cc
72	3.553±0.020Ad	3.663±0.121Ad	3.878±0.121Ae	62.893±0.238Aa	61.350±0.343Ba	60.976±0.254Ba

表 3 联苯肼酯亚致死质量浓度处理截形叶螨后不同时间 MFO 的动力学常数

Table 3 The kinetic parameters of MFO in *Tetranychus truncatus* treated with sublethal concentration of bifenthrin

时间 (h)	米氏常数 K_m ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)			最大反应速率 V_{\max} ($\mu\text{mol}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)		
	对照 CK	LC ₁₀	LC ₃₀	对照 CK	LC ₁₀	LC ₃₀
2	2.471±0.005Bd	2.499±0.005Ad	2.509±0.001Ade	0.060±0.001Aa	0.057±0.001ABa	0.056±0.001Ba
4	2.531±0.005Ba	2.547±0.002Aa	2.555±0.005Aa	0.049±0.001Ad	0.048±0.001Acd	0.047±0.001Ac
6	2.485±0.005Cc	2.516±0.003Bc	2.541±0.002Ab	0.055±0.001Abc	0.053±0.001Ab	0.049±0.000Bc
12	2.510±0.002Bb	2.530±0.004Ab	2.518±0.002Bcd	0.054±0.001Abc	0.049±0.001Bc	0.051±0.001Bb
24	2.524±0.002Ba	2.529±0.004Bb	2.562±0.010Aa	0.050±0.001Ad	0.050±0.000Ac	0.048±0.001Ac
36	2.509±0.003Bb	2.541±0.001Aa	2.538±0.001Ab	0.053±0.001Ac	0.047±0.001Bd	0.048±0.001Bc
48	2.499±0.003Cb	2.529±0.001Ab	2.521±0.002Bcd	0.054±0.001Abc	0.052±0.001Bb	0.053±0.001ABb
60	2.484±0.005Bc	2.531±0.002Ab	2.525±0.001Ac	0.056±0.001Ab	0.052±0.001Bb	0.053±0.001Bb
72	2.473±0.003Ccd	2.495±0.003Bd	2.505±0.002Ae	0.059±0.001Aa	0.056±0.001Ba	0.055±0.001Ba

3 讨论与结论

螨类对杀螨剂产生的代谢抗性实际上是解毒酶系代谢活性增强的结果 (Campos *et al.*, 1996)。He 等 (2009) 发现 3 种解毒酶活性显著升高是朱砂叶螨对阿维菌素产生抗性的重要原因。何林等 (2003) 发现朱砂叶螨对阿维菌素和甲氰菊酯产生抗药性同样与解毒酶活性的升高密切相关。王小军等 (2017) 研究表明 CarE、GSTs、MFO 的活性增大可促进土耳其斯坦叶螨对螺螨酯、甲氰菊酯和阿维菌素的抗性形成。本试验探究了亚致死质量浓度联苯肼酯处理截形叶螨雌成螨后, 其体内主要解毒酶系的比活力、酶动力学常数随时间的变化。结果显示联苯肼酯对截形叶螨雌成螨体内的解毒酶有诱导作用, 且诱导作用的大小随时间发生变化。这与尹显慧等 (2008) 用多杀菌素亚致死浓度处理小菜蛾后解毒酶活性的变化具有一定的时间效应的研究结果一致。LC₃₀ 处理下 CarE、GSTs (除 24 h 时) 比活力均显著高于 LC₁₀, 说明亚致死浓度越高对解毒酶系的诱导作用越大, 与汝阳等 (2017) 的研究结果一致。不同浓度的联苯肼酯对酶比活力的影响存在差异, 这可能是截形叶螨在不同浓度的药剂胁迫下采取的一种生存对策 (陈列忠等, 2005)。LC₃₀ 处理 CarE 比活力在 6-48 h 持续出现峰值, LC₁₀ 在 6 h 和 36 h 最大, 而对照 CarE 比活力峰值出现在 6 h 和 24 h; LC₁₀、LC₃₀ 处理 GSTs 比活力在 6 h 时达最大, 与对照一致; MFO 比活力出现两次最大值, 其中 LC₃₀ 处理最大值出现在 4 h 和 24 h, 与对照一致, 而 LC₁₀ 处理出现在 4 h 和 36 h。这与汝阳等 (2017) 二斑叶螨对阿维菌素的解毒代谢作用在 12 h 时最强的研究结果不一致, 这可能与截形叶螨的取食、睡眠等生理行为以及杀螨剂的种类有关, 可推测出联苯肼酯亚致死浓度对截形叶螨的某些生理行为产生了影响, 且随浓度的大小而改变。

酶动力学中 K_m 反映了酶与底物亲和力的大小, V_{max} 表示反应速度的快慢。本试验中 LC₁₀、LC₃₀ 处理截形叶螨雌成螨后, CarE 的 K_m 减小, V_{max} 增大, 而 GSTs 和 MFO 的 K_m 增大或变化不

显著, V_{max} 减小或变化不明显。表明 CarE 与底物的亲和力增大, 反应速率增大。这与何林等 (2003) 朱砂叶螨对阿维菌素产生抗性后, 其体内 CarE 的反应速度加快, 与底物的亲和力增强的研究结果一致。由此推测, CarE 在截形叶螨对联苯肼酯产生代谢抗性中起主导作用。

试验中对对照种群的三大解毒酶系比活力、酶动力学常数在不同时间点均有差异, 这可能与截形叶螨的生理活动有关。其体内解毒酶系的比活力、酶动力学常数如何随生理活动过程的变化规律, 有待进一步研究。

参考文献 (References)

- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye release. *Analytical Biochemistry*, 72 (1/2): 248-254.
- Campos F, Krupa DA, Dybus RA, 1996. Susceptibility of populations of twospotted spider mites from Florida, Holland and the Canary Islands to abamectin and characterization of abamectin resistance. *Journal of Economic Entomology*, 89(3): 594-601.
- Clark JM, Lee SH, Kim HJ, Yoon KS, Zhang A, 2001. DNA-based genotyping techniques for the detection of point mutations associated with insecticide resistance in Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. *Pest Management Science*, 57(10): 968-974.
- Chen LZ, Chen JM, Lv ZX, Shen Tu XP, Zhen XS, Xu HX, Zhang YF, Yu XP, 2005. Analysis of wilforine by HPLC. *Agrochemicals*, 44(4): 172-173. [陈列忠, 陈建明, 吕仲贤, 申屠旭萍, 郑许松, 徐红星, 张珏锋, 俞晓平, 2005. 雷公藤次碱的高效液相色谱分析方法. *农药*, 44(4): 172-173.]
- Cui YN, 2014. Study on identification of tetranychus spider mites using morphological classification and molecular technology. Master dissertation. Nanjing: Nanjing Agricultural University. [崔玉楠, 2014. 基于形态与分子技术相结合的叶螨鉴定法研究. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学.]
- Guo CC, 2007. Study on biological, ecological characteristics and control of *Tetranychus truncatus* Ehara. Master dissertation. Kunming: Southwest Forestry University. [郭长翠, 2007. 截形叶螨生物学和生态学特性及防治研究. 硕士学位论文. 昆明: 西南林业大学.]
- Gao P, Zhou YS, Meng XM, Li ZZ, Piao JZ, 2012. Changes of detoxicant enzymes activities in resistant population of *Tetranychus urticae* Koch to abamectin and esterase isozymes Analysis. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 43(5): 599-602. [高萍, 周玉书, 孟祥梅, 李忠洲, 朴静子, 2012. 抗阿维菌素的二斑叶螨解毒酶活力变化及其酯酶同工酶分析. *沈阳农业大学学报*, 43(5): 599-602.]

- Gao XJ, Shen HM, 2011. Resistance selection with fenpropathrin and the change of detoxification enzyme activities in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Acta Entomologica Sinica*, 54(1): 64–69. [高新菊, 沈慧敏, 2011. 二斑叶螨对甲氧菊酯的抗性选育及解毒酶活力变化. *昆虫学报*, 54(1): 64–69.]
- He HG, 2010. Fenpropathrin and avermectin resistance, and esterase gene cloning and expression in *Panonychus citri* (McGregor). Doctoral dissertation. Chongqing: Southwest University. [何恒果, 2010. 桔全爪螨对甲氧菊酯和阿维菌素的抗性及其酯酶基因的克隆与表达研究. 博士论文. 重庆: 西南大学.]
- He L, Tan SL, Cao XF, Zhao ZM, Deng XP, Wang JJ, 2003. Study on resistance selection and activity of detoxification enzyme in *Tetranychus cinnabarinus* (Boiduval). *Chinese Journal of Pesticide Science*, 5(4): 23–29. [何林, 谭仕禄, 曹小芳, 赵志模, 邓新平, 王进军, 2003. 朱砂叶螨的抗药性选育及其解毒酶活性研究. *农药学报*, 5(4): 23–29.]
- He L, Xue CH, Wang JJ, Li M, Lu WC, Zhao ZM, 2009. Resistance selection and biochemical mechanism of resistance to two Acaricides in *Tetranychus cinnabarinus* (Boiduval). *Pesticide Biochemistry & Physiology*, 93(1): 47–52.
- Huang SQ, Xu HH, Ceng DQ, Li XF, 2005. Methods for the bioassay of acarid infestation in farmland. *Plant Protection*, 30(1): 79–81. [黄素青, 徐汉虹, 曾东强, 李新芳, 2005. 农田害螨的几种生物测定方法. *植物保护*, 30(1): 79–81.]
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB, 1974. Glutathiones S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(22): 7130–7139.
- Kim M, Sim C, Shin D, Suh E, Cho K, 2006. Residual and sublethal effects of fenpyroximate and pyridaben on the instantaneous rate of increase of *Tetranychus urticae*. *Crop Protection*, 25(6): 542–548.
- Liu H, Adili Shataer, Li H, Tuersunguli Tuohuti, 2013. Effects of main meteorological factors on the population fluctuation of *Tetranychus truncatus* Ehara of *Zizyphus jujube*. *Journal of Xinjiang Agricultural University*, 36(1): 51–55. [刘珩, 阿地力·沙塔尔, 李宏, 吐尔逊古丽·托呼提, 2013. 主要气象因子对枣树截形叶螨种群数量变动的的影响. *新疆农业大学学报*, 36(1): 51–55.]
- Lu WC, 2017. Insight to competitive mechanisms between *T. cinnabarinus* and *T. urticae* in toxicology. Doctoral dissertation. Chongqing: Southwest University. [卢文才, 2017. 二斑叶螨对朱砂叶螨竞争性扩张的毒理学机制研究. 博士学位论文. 重庆: 西南大学.]
- Ru Y, Chen YN, Shang SQ, Zhang XH, 2017. Effect of sublethal dose of avermectin on the activities of detoxifying enzymes in *Tetranychus urticae*. *Journal of Gansu Agricultural University*, 52(1): 87–91, 96. [汝阳, 陈耀年, 尚素琴, 张新虎, 2017. 阿维菌素亚致死剂量对二斑叶螨解毒酶系的影响. *甘肃农业大学学报*, 52(1): 87–91, 96.]
- Van LT, Van NP, Vanholme B, Dermauw W, Nauen R, Tirry L, 2011. Parallel evolution of cytochrome b mediated bifentazate resistance in the citrus red mite *Panonychus citri*. *Insect Mol. Biol.*, 20(1): 135–140.
- Wilkinson GN, 1961. Statistical estimations in enzyme kinetics. *The Biochemical Journal*, 80(2): 324–332.
- Wang JW, 2007. Occurrence regularity and comprehensive control of *Tetranychus truncatus* Ehara. *Rural Science & Technology*, (2): 24. [王建伟, 2007. 截形叶螨发生规律及综合防治. *农村科技*, (2): 24.]
- Wang L, Zhang YJ, Wu QJ, Xie W, Liu YC, Wang SL, 2016. Control effects of garlic intercropping on spider mite *Tetranychus truncatus* on eggplants. *Journal of Plant Protection*, 43(6): 995–1000. [王玲, 张友军, 吴青君, 谢文, 刘聪, 王少丽, 2016. 间作大蒜对茄子截形叶螨的防控效果. *植物保护学报*, 43(6): 995–1000.]
- Wang XJ, Bao JH, Zhang YN, Zhu RW, Zhao YY, 2017. Selection for insecticide resistance of *Tetranychus turkestanii* strains and change in the activity of detoxification enzymes. *Plant Protection*, 43(4): 70–75. [王小军, 包建红, 张燕娜, 祝儒伟, 赵伊英, 2017. 土耳其斯坦叶螨对杀螨剂的抗性选育及解毒酶活力变化. *植物保护*, 43(4): 70–75.]
- Wang YY, Gao N, Li HH, Feng GF, Xiao YP, 2011. Study on synthesis of miticide bifentazate. *Fine Chemical Intermediate*, 41(6): 8–10. [王元元, 高宁, 李辉辉, 冯根锋, 肖亚平, 2011. 杀螨剂联苯腈酯的合成研究. *精细化工中间体*, 41(6): 8–10.]
- Xu S, Chen KG, Yu Y, Chen GM, Chen BX, 2014. Toxicity test and field efficacy of bifentazate against *Panonychus citri* McGregor. *Plant Protection*, 40(5): 191–195. [徐淑, 陈凯歌, 余瑶, 陈耿民, 陈炳旭, 2014. 联苯腈酯对柑橘全爪螨的毒力测定及田间防效. *植物保护*, 40(5): 191–195.]
- Yin XH, Wu QJ, Li XF, Zhang YJ, Xu BY, 2008. Effect of sublethal concentrations of spinosad on the activities of detoxifying enzymes in the larvae of diamondback moth *Plutella xylostella*. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 10 (1): 28–34. [尹显慧, 吴青君, 李学锋, 张友军, 徐宝云, 2008. 多杀菌素亚致死浓度对小菜蛾解毒酶系活力的影响. *农药学报*, 10(1): 28–34.]
- Yong XJ, Ding W, Zhang YQ, Li MX, 2011. Bioactivity and action modes of bisdemethoxycurcumin against *Tetranychus cinnabarinus* Bois. (Acari: Tetranychidae). *Chinese Journal of Applied Ecology*, 22(6): 1592–1598. [雍小菊, 丁伟, 张永强, 李明霞, 2011. 双去甲氧基姜黄素对朱砂叶螨的生物活性及作用方式. *应用生态学报*, 22(6): 1592–1598.]
- Zhang CY, Amina, Ma DY, Gao YH, 2014. Resistance monitoring of resistance of different *Tetranychus truncatus* Ehara populations to seven acaricides of four counties in southern Xinjiang. *Journal of Xinjiang Agricultural University*, 37(3): 223–226. [张传燕, 阿米娜, 马德英, 高有华, 2014. 新疆南疆 4 地区枣树截形叶螨种群对 7 种杀螨剂的抗药性检测. *新疆农业大学学报*, 37(3): 223–226.]
- Zhao WD, Wang KY, Jiang XY, Yi MQ, 2003. Resistance selection by abamectin, pyridaben and fenpropathrin and activity change of detoxicant enzymes in *Tetranychus urticae*. *Acta Entomologica Sinica*, 46(6): 788–792. [赵卫东, 王开运, 姜兴印, 仪美芹, 2003. 二斑叶螨对阿维菌素、哒螨灵和甲氧菊酯的抗性选育及其解毒酶活力变化. *昆虫学报*, 46(6): 788–792.]