

水稻二化螟抗药性监测方法^{*}

吴敏 张真真 高聪芬^{**}

(南京农业大学植物保护学院农药系/教育部农作物生物灾害综合治理重点实验室 南京 210095)

摘要 本文首先介绍了二化螟 *Chilo suppressalis* (Walker) 抗药性监测的方法:点滴法和稻苗浸渍法。其中点滴法已有标准化的生测规程,其适用于以触杀作用为主的杀虫剂抗性监测,但无法准确反映以胃毒作用为主的杀虫剂的毒力效果,因此,本文新建了以胃毒作用为主的双酰胺类或微生物杀虫剂 Bt 等的抗性监测方法——稻苗浸渍法。

关键词 二化螟, 抗药性点滴法, 稻苗浸渍法, 双酰胺类杀虫剂

Methods of insecticides resistance monitoring of the striped stem borer, *Chilo suppressalis*

WU Min ZHANG Zhen-Zhen GAO Cong-Fen^{**}

(Department of Pesticide, Nanjing Agricultural University; Key Laboratory of Integrated Management of Crop Diseases and Pests, Ministry of Education, Nanjing 210095, China)

Abstract Methods of insecticide resistance monitoring, including micro-topical and rice seedling dipping methods, adapted for resistance monitoring in the striped stem borer, are introduced. The topical method is used to bioassay contact insecticides. However, this method does not accurately reflect the activity of insecticides which act after being ingested. The rice seedling dipping technique was therefore established to detect resistance to insecticides that require ingestion, such as diamides and Bt microbial insecticides.

Key words *Chilo suppressalis*, insecticides resistance, topical method, rice seedling dipping method, diamides

二化螟 *Chilo suppressalis* (Walker), 是我国长江流域稻区的重要害虫之一, 可为害水稻形成枯心、白穗、枯孕穗等症状, 造成严重损失 (Pathak, 1968; Dale, 1994)。目前主要依靠化学药剂来防治二化螟, 由于药剂的长期、连续及不合理使用, 二化螟对田间常用的多种药剂都产生了不同水平的抗性, 严重影响了生产上的防治效果, 但由于目前乃至今后相当长一段时期内还没有其他措施能够有效替代化学防治, 作为杀虫剂抗性治理策略重要组成部分的二化螟抗药性监测及其技术研究就显得尤为重要。

目前, 二化螟的抗药性监测技术多采用点滴法, 该法适用于以触杀作用为主的杀虫剂, 包括 20 世纪 80 年代开始施用的沙蚕毒素类的杀虫单、杀虫双; 90 年代之后广泛使用的有机磷杀虫剂三唑

磷与毒死蜱, 及近年来防治效果较好的大环内酯类的阿维菌素、甲维盐等药剂。自 2008 年双酰胺类药剂氯虫苯甲酰胺和氟虫双酰胺进入市场以来, 迅速地引起了人们广泛的关注, 此类药剂作用机理独特, 对鳞翅目害虫具有非常好的防效, 成为水稻螟虫抗性治理的重要替代品种, 被广泛用于水稻害虫防治, 目前已有报道部分地区二化螟、小菜蛾、蔷薇斜条卷叶蛾及稻纵卷叶螟等害虫的田间不同种群对氯虫苯甲酰胺均有较大敏感性差异 (Sail *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2011), 预示着较高的潜在抗性风险, 因此, 为了保护新颖杀虫剂资源, 延长其使用寿命, 应及早进行二化螟对该类药剂的抗性监测。由于双酰胺类药剂以胃毒作用为主, 点滴法不能准确地反映此类药剂对二化螟的活性, 故建

^{*} 资助项目: 公益性行业 (农业) 科研专项 (201203038)。

^{**} 通讯作者, E-mail: gaocongfen@njau.edu.cn

收稿日期: 2013-02-06, 接受日期: 2013-02-25

立了一种新的监测方法——稻苗浸渍法,旨在为进行以胃毒作用为主的二化螟防治药剂的抗性监测提供技术指导。

1 点滴法

参照二化螟抗药性监测技术规程的4龄幼虫点滴法(全国农业技术推广服务中心和南京农业大学,2011)。

1.1 药液配制

在电子天平上用容量瓶称取一定量的原药,用有机溶剂(如丙酮等,杀虫单、杀螟丹等用体积为1:1的丙酮:水混合液)溶解,配制成一定浓度的母液,用移液管或移液器吸取一定量的母液加入青霉素瓶,用上述溶剂配制成一定质量浓度的药液供预备试验,根据预备试验结果,再按照等比法用青霉素瓶配制5~7个系列质量浓度,每个浓度的药液量不宜少于2 mL。

1.2 处理方法

挑取每头体重6~9 mg的4龄中期幼虫置于盛有人工饲料(刘慧敏等,2008)的培养皿中,每皿5头,每浓度重复6次,共30头,供试药液浓度按从低到高的顺序处理,用容积为0.04~0.06 μL 的毛细管点滴器将合适浓度的药剂丙酮溶液点滴至幼虫胸部背板上,以点滴丙酮(或丙酮:水=1:1)为空白对照。处理后的培养皿转移至温度(28 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、光周期L:D=16:8的条件下饲养和观察。

1.3 虫体检查

分别于处理后48 h(有机磷类杀虫剂),72 h(大环内酯类杀虫剂),96 h(沙蚕毒素类杀虫剂),120 h(昆虫生长调节剂类杀虫剂)检查试虫死亡情况,记录总虫数和死虫数。以毛笔触动幼虫虫体不能协调运动为死亡标准,计算毒力回归方程、 LD_{50} 及其95%置信限。

2 稻苗浸渍法

2.1 材料与方法

2.1.1 供试虫源 于2010年从浙江、江苏、湖南、湖北及安徽5省采集了6个地区二化螟田间种群,采用中国农业科学院植物保护研究所(2009)的人工饲料配方进行室内饲养,饲养条件:(28 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、光周期L:D=16:8,以体重0.45~0.85 mg的2龄中期幼虫为标准试虫供试。

2.1.2 供试药剂 97.5%氟虫双酰胺原药,先正达(中国)投资有限公司提供;拜耳(中国)有限公司提供97.3%氯虫苯甲酰胺原药;试验时将原药用二甲基甲酰胺(DMSF)溶解,配成高浓度母液,加入10%乳化剂Triton X-100,并用蒸馏水等比稀释配制各处理药液。

2.1.3 测定方法 选取在直径5 cm花盆中生长3周(约25 cm高)的稻苗,每盆约30棵,去除老叶和死叶,将花盆表土上倒入少量琼脂做固定,待琼脂凝固后备用。

以二甲基甲酰胺为溶剂,将原药配成高浓度母液(含10%的曲拉通),再用清水将母液等比稀释成不同浓度的药液作为处理,以含有同最高浓度药液等量的DMSF和Triton X-100的清水为对照。将稻苗在药液中浸渍10 s后取出,晾干至无明水,将稻茎齐根剪下,去除上部叶片,留下5.5~6 cm的茎秆;放入事先准备好的直径为6.5 cm的培养皿(每皿底部垫入4层滤纸,加入3 mL无菌水保湿)中,每皿15个茎秆;用毛笔挑入10头二化螟2龄中期幼虫,用两层黑棉布覆盖后再盖上培养皿,以防二化螟幼虫逃逸。每次试验设5~6个处理,每处理重复4次。将处理后的二化螟幼虫放置于培养箱,温度(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,RH=70%,光周期为L:D=16:8。6 d后检查二化螟幼虫死亡情况,以用毛笔轻触虫体,虫体不能协调运动为死亡(图1)。

2.1.4 数据处理 采用POLO Plus软件计算毒力回归式。计算参数包括:毒力回归方程、斜率b值及其标准误、 LC_{50} 值及其95%置信限。

2.2 结果与分析

采用稻苗浸渍法测定了5省7地二化螟田间种群对氯虫苯甲酰胺和氟虫双酰胺的敏感性,结果(表1,表2)发现,二化螟田间种群对两种双酰胺类药剂的敏感性有所差异,且不同地理种群对同一药剂的敏感性也有差异。就氯虫苯甲酰胺而言,最敏感种群为浙江苍南($\text{LC}_{50} = 2.616 \text{ mg/L}$),而敏感性最低为江苏仪征种群($\text{LC}_{50} = 8.213 \text{ mg/L}$),两者间相差3.1倍(表1);而对于氟虫双酰胺,最敏感种群为浙江瑞安($\text{LC}_{50} = 0.419 \text{ mg/L}$),敏感性最低为浙江苍南种群($\text{LC}_{50} = 1.474 \text{ mg/L}$),相差2.7倍(表2)。该方法基本准确地反映了氯虫苯甲酰胺和氟虫双酰胺对二化螟的活性差

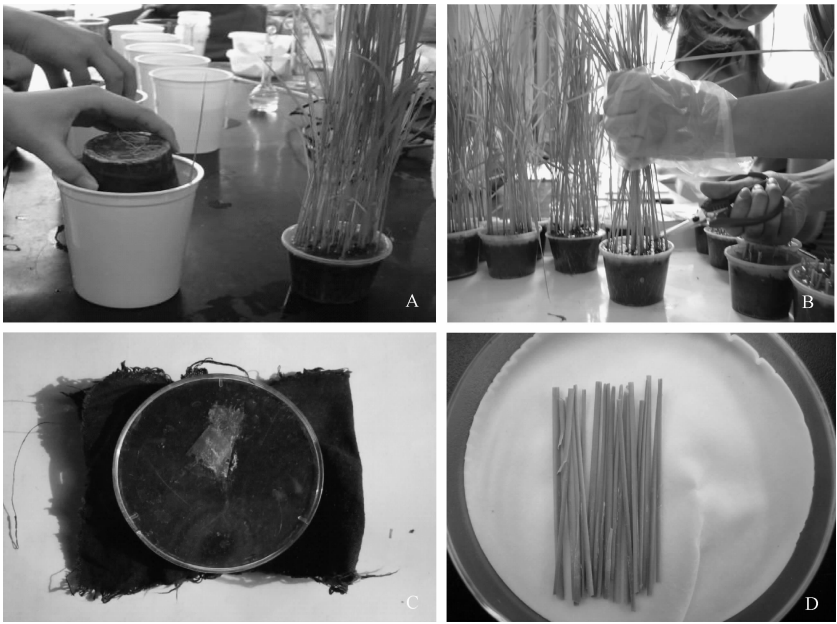


图 1 稻苗浸渍测定方法操作示意图

Fig. 1 Operation chart of rice seedling dipping bioassay method

A. 将杯栽供试稻苗倒置在配制好的药液中,浸渍到稻苗基部,持续 10 s 后取出;B. 将稻茎齐根剪下,去除上部叶片,留下 5.5 ~6 cm 的茎秆;C. 将稻茎放入事先准备好的直径 6.5 cm 的培养皿(每皿底部垫入 4 层滤纸,加入 3 mL 蒸馏水保湿)中,每皿 15 根茎秆;D. 用两层黑棉布覆盖后再盖上培养皿盖,处理后的二化螟幼虫放置于培养箱,温度(25 ± 1)℃,RH = 70%,光周期为 L:D = 16:8。

A. the seedlings were immersed in insecticide solution up to the base of the stems for 10 s; B. cut at the base of the stems on the soil surface and reserved stems without leaves of approximately 5.5 – 6 cm in length;C. put 15 stems in each petri dish (6.5 cm in diameter). 4 filter papers were laid on each base of the dish, and the filter paper were moistened by 3 mL distilled water;D. infested petri dishes were covered by two-tier black cloth and stored at (25 ± 1)℃, 70% RH and 16h:8h (light: dark) photoperiod.

表 1 二化螟对氯虫苯甲酰胺的敏感性

Table 1 Susceptibility of *Chilo suppressalis* to chlorantraniliprole

采集地点 Collecting location	种群 Colonies	供试虫数 Tested number	斜率 ± 标准误 Slope ± SE	卡方值 $\chi^2(df)$	致死中量 LC ₅₀ (mg/L)	95% 置信限 95% FL(mg/L)
浙江瑞安 Ruian, Zhejiang	RA10	272	1.002(0.135)	0.334(3)	4.671	2.749 – 7.426
浙江苍南 Cangnan, Zhejiang	CN10	274	1.285(0.156)	6.509(3)	2.616	0.835 – 7.656
江苏仪征 Yizheng, Jiangsu	YZ10	279	1.012(0.112)	3.149(3)	8.213	3.887 – 15.957
湖南攸县 Youxian, Hunan	YX10	275	1.352(0.162)	7.743(3)	2.970	0.902 – 10.242
湖北荆州 Jingzhou, Hubei	JZ10	277	0.956(0.132)	2.945(3)	4.396	2.538 – 7.088
安徽黄山 Huangshan, Anhui	HS10	271	1.078(0.188)	1.638(3)	7.368	3.929 – 13.523

异及不同地理二化螟种群对药剂的耐药性差异。结果统计发现,采用该法进行二化螟的生物测定具有对照死亡率低,重复性好,可操作性强的优点,适用于双酰胺类药剂对二化螟的抗药性监测。

3 讨论

二化螟的抗药性问题一直受到人们的广泛关注,为了保证杀虫剂田间防治效果,二化螟的抗药性监测及其技术研究得到了更多的重视。早期的

表 2 二化螟对氟虫双酰胺的敏感性

Table 2 Susceptibility of *Chilo suppressalis* to flubendimide

采集地点 Collecting location	种群 Colonies	供试虫数 Tested number	斜率 ± 标准误 Slope ± SE	卡方值 $\chi^2(df)$	致死中量 LC ₅₀ (mg/L)	95% 置信限 95% FL (mg/L)
浙江瑞安 Ruian, Zhejiang	RA10	275	0.562 (0.092)	0.771 (4)	0.419	0.142 – 0.891
浙江苍南 Cangnan, Zhejiang	CN10	278	0.729 (0.095)	1.801 (4)	1.474	0.795 – 2.589
江苏仪征 Yizheng, Jiangsu	YZ10	280	0.852 (0.109)	1.462 (3)	0.593	0.341 – 0.947
湖南攸县 Youxian, Hunan	YX10	275	0.710 (0.098)	5.018 (4)	0.540	0.135 – 1.355
湖北荆州 Jingzhou, Hubei	JZ10	277	1.124 (0.145)	0.747 (3)	0.628	0.393 – 0.958
安徽黄山 Huangshan, Anhui	HS10	276	0.985 (0.158)	0.593 (4)	1.341	0.633 – 2.483

抗药性监测多为 6 龄幼虫点滴法(田学志等, 1991;赵学平等,2000)由于 6 龄幼虫饲养时间长, 且费时费力,一致性差,后改为 4 龄幼虫(曹明章等,2001),该法缩短了饲养时间,操作简单,且便于检查结果,被广泛地应用于二化螟对以触杀作用为主的杀虫剂的抗性监测。

稻苗浸渍法的建立适用于以胃毒作用为主的药剂的抗性监测,以此方法进行二化螟对双酰胺类药剂的抗性监测,能够更为准确地反映该类药剂的胃毒活性;首先,试验材料选取生长 3 周左右的水稻,给 2 龄幼虫提供浸渍过药剂的新鲜稻苗,与在田间喷雾防治二化螟的实际情况较为一致,所得结果能够更客观地指导田间合理用药;其次,本方法的试虫选用 2 龄中期幼虫,与高龄幼虫监测法相比,低龄幼虫发育进度整齐和个体差异较小,不但易于试虫的标准化,而且简便省时;与初孵幼虫相比,对照存活率高,操作便捷;第三,选用 2 龄幼虫为试虫也与田间二化螟 2 龄幼虫钻蛀前防治的时期更接近,测定结果更具代表性。

稻苗浸渍法由国际杀虫剂抗性行动委员会 (IRAC) 的 Russell Slater 提供,稍有改动:一、每个培养皿中放入的稻茎数由 30 根改为 15 根,减少了稻苗的数量,能够在确保足够试虫取食的同时减少工作量,也缩短检查结果的的时间,使试验的操作更省时省力;二、培养皿内铺垫 3 张滤纸并用 1 mL 蒸馏水湿润改为铺垫 4 张滤纸并用 3 mL 蒸馏水湿润,能更好地保持培养皿小空间内的湿度,确保试虫适宜的生存条件;三、将检查结果的时间由 5 d 改为 6 d,因为双酰胺类药剂作用缓慢,经过数次的验证,确定处理 6 d 后在试虫的死亡判断方面更容易,可减少人为误差,试验结果重现性好。

综上,二化螟的抗药性监测方法主要为点滴法和稻苗浸渍法,对于作用方式不同的杀虫剂,选

用能准确反映其活性的监测方法,能够更准确、更有针对性地反映该药剂的抗性水平,可有效提高抗性监测的准确性和可靠性。两种方法相结合,在二化螟的抗药性监测中推广使用,可为指导田间合理用药提供科学依据。

参考文献 (References)

Dale D, 1994. Insect pests of the rice plant-their biology and ecology// Heinrichs EA (ed.). *Biology and Management of Rice Insects*. IRRI, Los-Banos, The Philippines. 363 – 485.

Huang J, Wu SF, Ye GY, 2011. Evaluation of lethal effects of chlorantraniliprole on *Chilo suppressalis* and its larval parasitoid, *Cotesia chilonis*. *Agric. Sci. China*, 10 (7): 1134 – 1138.

Pathak MD, 1968. Ecology of rice pests. *Annu. Rev. Entomol.*, 13:257 – 294.

Sial AA, Brunner JF, Doerr MD, 2010. Susceptibility of *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae) to two new reduced-risk insecticides. *J. Econ. Entomol.*, 103 (1):140 – 146.

Wang XL, Li XY, Shen AD, Wu YD, 2010. Baseline susceptibility of the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) to chlorantraniliprole in China. *J. Econ. Entomol.*, 103(3):843 – 848.

Zheng XS, Ren XB, Su JY, 2011. Insecticide susceptibility of rice leaffolder, *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae) in China. *J. Econ. Entomol.*, 4(2):653 – 658.

曹明章, 沈晋良, 张绍明, 周威君, 张金振, 吕梅, 2003. 2002 年江苏省二化螟抗药性检测及治理. *植物保护*, (5):34 – 37.

刘慧敏, 李闪红, 王满囤, 张国安, 2008. 二化螟人工饲料关键因子的优化及其优化配方的饲养效果. *昆虫知识*, 45 (2):310 – 314.

田学志, 高保宗, 石家胜, 1991. 安庆地区水稻二化螟抗

- 药性研究. 安徽农业科学, 1:61 – 66.
- 赵学平, 王强, 吴长兴, 2000. 二化螟对杀虫剂的敏感性
及抗药性研究. 浙江农业学报, (6):83 – 87.
- 全国农业技术推广技术服务中心, 南京农业大学, 2011.
水稻二化螟抗药性监测技术规程, 毛细管点滴法. 北
京:中国农业出版社. 1 – 9.
- 中国农业科学院植物保护研究所, 2009. 一种二化螟的人
工饲料, 其制备方法及其饲养方法. 中国专利.
200910080336.