

小菜蛾对三氟甲吡醚的抗性风险评价 与抗性生化机制研究*

孙 杨** 秦文婧 黄水金*** 秦厚国

(江西省农业科学院植物保护研究所, 南昌 330200)

摘 要 【目的】明确小菜蛾 *Plutella xylostella* (Linnaeus) 对三氟甲吡醚的抗性风险和抗性生化机制, 为三氟甲吡醚的合理使用提供科学依据。【方法】采用 Tabashnik & McGaughey 的阈值性状分析方法评估小菜蛾对三氟甲吡醚的抗性风险; 采用浸叶法测定增效剂(胡椒基丁醚、磷酸三苯酯和顺丁烯二酸二乙酯)对三氟甲吡醚的增效作用, 通过酶动力学方法测定了小菜蛾对三氟甲吡醚抗性和敏感品系的谷胱甘肽-S-转移酶、酯酶和多功能氧化酶的活性。【结果】经过 18 代次筛选, 小菜蛾种群对三氟甲吡醚的抗性水平上升至 14.8 倍, 小菜蛾对三氟甲吡醚的抗性现实遗传力(h^2)为 0.1558; 当 $h^2=0.1558$ 时, 在致死率为 50%-90% 的选择压力下, 预计小菜蛾对三氟甲吡醚抗性增加 10 倍分别需要 16.1-7.3 代。在小菜蛾三氟甲吡醚抗性品系中, 酯酶和多功能氧化酶比活力均显著高于敏感品系, 分别为敏感品系的 1.34 倍和 1.45 倍; 谷胱甘肽-S-转移酶比活力与敏感品系的无显著差异。抗性品系的酯酶抑制剂磷酸三苯酯和多功能氧化酶抑制剂胡椒基丁醚对三氟甲吡醚具有明显增效作用, 增效倍数分别为 1.21 倍和 1.43 倍; 谷胱甘肽-S-转移酶抑制剂顺丁烯二酸二乙酯对三氟甲吡醚没有明显增效作用。【结论】小菜蛾对三氟甲吡醚产生抗性的风险较大, 酯酶和多功能氧化酶活性的升高可能是小菜蛾对三氟甲吡醚产生抗性的重要机制。

关键词 小菜蛾, 三氟甲吡醚, 抗性风险, 生化机制

Risk assessment and biochemical mechanisms responsible for resistance to pyridalyl in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus)

SUN Yang** QIN Wen-Jing HUANG Shui-Jin*** QIN Hou-Guo

(Institute of Plant Protection, Jiangxi Academy of Agricultural Science, Nanchang 330200, China)

Abstract [Objectives] A risk assessment and investigation of the biochemical mechanisms underlying resistance to pyridalyl in *Plutella xylostella* (Linnaeus) were conducted to provide a theoretical basis for the rational application of pyridalyl for controlling this pest. [Methods] The threshold character/trait analysis method from Tabashnik & McGaughey was used to assess the risk of resistance. The bioassay was conducted using the leaf dipping method. Piperonyl butoxide (PBO), triphenyl phosphate (TPP), and diethyl maleate (DEM) were used in synergy bioassays. The enzyme kinetic method was used to determine the activities of glutathione-S-transferase, esterase, and mixed-functional oxidases, in both resistant and susceptible strains. [Results] The *P. xylostella* strain used in this study developed 14.8-fold resistance to pyridalyl after 18 generations of selection with a realized resistance heritability (h^2) of 0.1558. Pyridalyl resistance is expected to increase 10 fold in 16.1 to 7.3 generations under selective pressures of 50% to 90%. Compared to the susceptible strain, esterase and mixed-functional oxidase activity in a pyridalyl-resistant strain significantly increased by 1.34 and 1.45-fold, respectively. In synergy bioassays, both TPP and PBO significantly increased the toxicity of pyridalyl in the resistant strain, with synergistic ratios of 121.00%

*资助项目 Supported projects: 江西省科技支撑计划项目 (20122BBF60102); 国家公益性行业(农业)科研专项 (201103021)

**第一作者 First author, E-mail: sun2007yang@126.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: sjhuang@aliyun.com

收稿日期 Received: 2017-09-22, 接受日期 Accepted: 2018-01-30

and 143.00%, respectively. DME had no obvious synergistic effect. **[Conclusion]** These results indicated that *P. xylostella* could develop significant resistance to pyridalyl. Increased esterase and mixed-functional oxidase activity may play an important role in such resistance.

Key words *Plutella xylostella*, pyridalyl, resistance risk, biochemical resistance mechanisms

小菜蛾 *Plutella xylostella* (Linnaeus) 属鳞翅目菜蛾科, 是世界性的十字花科蔬菜重要害虫, 常常给十字花科蔬菜生产造成严重危害 (Furlong *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016)。化学药剂防治是最为迅速有效的方法, 然而, 由于小菜蛾世代周期短, 年发生代数多, 抗逆力强, 目前小菜蛾已对许多药剂产生了严重的抗药性 (Zhou *et al.*, 2011; 周晓榕等, 2013), 导致许多药剂在登记的推荐用量下无法有效控制小菜蛾的为害。新型杀虫剂的创制与应用是解决害虫抗性的主要途径。然而, 新型杀虫剂研发所需的人力、物力和时间投入越来越多, 研发的难度越来越大。因此, 采取有效措施延缓害虫对现有杀虫剂产生抗性的速度, 对于保护和利用现有的杀虫剂资源, 保障作物安全生产具有重要的现实意义。

三氟甲吡醚 (Pyridalyl), 又称啶虫丙醚, 是日本住友化学株式会社研发的新型杀虫剂 (徐文平, 2006)。三氟甲吡醚具有独特的化学结构和杀虫机理, 主要用于防治鳞翅目和缨翅目害虫, 如小菜蛾、斜纹夜蛾、棉铃虫、甜菜夜蛾、棕榈蓟马、烟蓟马等 (Sakamoto *et al.*, 2004; Isayama *et al.*, 2005)。三氟甲吡醚的杀虫机理尚不清楚, 有研究推测三氟甲吡醚在细胞色素 P450 的作用下产生活性氧 (Reactive oxygen species, ROS), ROS 导致蛋白质的降解和细胞坏死 (Powell *et al.*, 2011)。

害虫抗药性风险评价和抗药性机理研究是制定害虫抗药性治理方案的前提工作。三氟甲吡醚于 2004 年首次投放日本市场, 2007 年在中国获得农药临时登记, 迄今已有 10 余年的使用历史。然而, 目前并没有田间小菜蛾种群对三氟甲吡醚产生抗性的报道, 也未见有关小菜蛾对三氟甲吡醚抗性机制的研究文献。为了延缓小菜蛾对三氟甲吡醚产生抗性的速度, 延长该药的使用寿命和制定预防性的抗性治理策略, 本研究通过室

内抗性选育以明确小菜蛾对三氟甲吡醚的抗性发展规律和抗性风险, 以敏感品系和筛选获得的小菜蛾三氟甲吡醚抗性品系为对象, 研究其抗性产生的生化机制, 以期三氟甲吡醚的合理应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

小菜蛾相对敏感品系和三氟甲吡醚抗性品系: 供试小菜蛾于 2011 年采自江西省南昌县郊区菜地, 用蛭石萝卜苗法 (刘传秀等, 1993) 在养虫室内不接触任何药剂连续饲养作为相对敏感品系。从此相对敏感品系中分出一部分, 采用群体汰选法进行三氟甲吡醚抗性选育 18 代, 获得小菜蛾三氟甲吡醚抗性品系。

1.2 供试药剂、试剂与仪器

10.5%三氟甲吡醚 EC, 江西正邦生物化工有限公司技术部提供。

α -乙酸萘酯(α -NA)、 α -萘酚、对硝基苯酚, 广州齐云生物技术有限公司; 固蓝 RR 盐, 南京生工生物技术有限公司; 对硝基苯甲醚, 瑞士 Adamas-beta 公司; 还原型辅酶 II (NADPH), Roche 公司; 牛血清白蛋白、考马斯亮蓝 G-250, 上海蓝季科技发展公司; 苯甲基磺酰氟 (PMSF)、二硫代苏糖醇 (DTT)、苯基硫脲 (PTU)、2,4-二硝基氯苯 (CDNB)、还原性谷胱甘肽 (GSH)、胡椒基丁醚 (PBO)、磷酸三苯酯 (TPP)、顺丁烯二酸二乙酯 (DEM), 上海晶纯生化科技股份有限公司。

UV9100 型紫外可见分光光度计, 北京莱伯泰科仪器有限公司。

1.3 抗性选育

当小菜蛾幼虫大部分进入 3 龄时, 根据上一

代测定的 LC_{50} 值配制相应浓度的三氟甲吡醚溶液, 用小型手持式喷壶将药液均匀地喷洒至带虫的萝卜苗上, 3 d 后将存活幼虫转移至新鲜无药的萝卜苗上进行饲养。汰选过程中, 根据每一代的生物测定结果以及幼虫存活情况逐步提高药剂汰选浓度。监测每一代的毒力回归线、 LC_{50} 值及 95% 置信限。

1.4 毒力测定

采用浸叶法进行毒力测定 (NY/T 2360-2013)。根据预试验结果, 按照等比例方法, 用蒸馏水将药剂稀释配制成其相应的 5 个系列质量浓度药液备用。取新鲜甘蓝 *Brassica oleracea* L. 叶片, 用打孔器打成直径 6 cm 的圆片若干, 然后将圆片浸在不同浓度药液中 10 s 后取出, 置于 25℃ 晾干, 将晾干的圆片放入直径 7 cm 的培养皿中, 每个培养皿中放 1 片, 并接入 10 头 3 龄小菜蛾幼虫, 覆盖双层吸水卷纸, 盖上培养皿盖。将其置于温度 (25±1℃)、相对湿度 65%±5%、光周期 14 L: 10 D 的人工养虫室中饲养, 药剂处理 72 h 后统计死亡率, 以尖锐镊子轻触虫体, 不能协调运动视为死亡。每个药剂浓度重复 4 次, 并设清水对照。

1.5 抗性风险评估

根据每代抗性筛选时所得的毒力资料, 采用 Tabashnik 和 McGaughey (1994) 的阈性状分析方法计算抗性现实遗传力 h^2 ($h^2 = R/S$)。其中: h^2 为现实遗传力; R 为选择反应, 表示子代平均表现型值与整个亲本群体平均表现型值之差, $R = [\log(\text{终 } LC_{50}) - \log(\text{初 } LC_{50})]/n$, n 为所选择的代数; S 为选择差异, 表示受选亲本平均表现型值与整个亲本群体的平均表现型值之差, $S = i\delta p$; i 为选择强度, $i \approx 1.583 - 0.0193336p + 0.0000428p^2 + 3.65194/p$ ($10 < p < 80$); $p = (100\% - \text{平均校正死亡率}) \times 100$, 平均校正死亡率是抗性选育中各代死亡率用 Abbott 公式校正后的平均值; δp 为表现型标准差, 是筛选各代的毒力回归线斜率平均值的倒数, $\delta p = [1/2(\text{初斜率} + \text{终斜率})]^{-1}$ 。根据计算得到的抗性现实遗传力 h^2 , 预

测筛选后抗性上升 x 倍所需的代数 [$Gx = \lg x / (h^2 S)$], 以及推算在不同选择压力 (啉虫酰胺对小菜蛾的致死率分别为 50%、60%、70%、80% 和 90%) 下抗性上升 10 倍所需的代数 [$G = R^{-1} = 1/(h^2 S)$]。

1.6 解毒酶活性测定

参考 Han 等 (1998) 方法测定酯酶活性, 挑选 5 头 4 龄幼虫, 加入 1 000 μL 磷酸缓冲液 (0.1 mol/L、pH=7.0, 含 0.1% TritonX-100) 冰浴匀浆 2 min。将匀浆液于 4℃ 10 000 r/min 条件下离心 10 min, 取上清液在 4℃ 12 000 r/min 条件下离心 30 min, 最后所得上清液作为酶源, 稀释 10 倍制备酶液。于比色皿中依次加入底物 2 000 μL 与显色剂的混合液 (含 2.1 mmol/L α -NA、2.1 mmol/L 固蓝 RR 盐), 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 900 μL 和酶液 100 μL , 混匀, 27℃ 温育 5 min 后置于分光光度计 450 nm 波长下测定光密度值。

参考 Wu 和 Miyata (2005) 方法测定谷胱甘肽-S-转移酶活性, 挑取 5 头 4 龄幼虫, 加入 1 000 μL 磷酸缓冲液 (0.1 mol/L、pH=7.0, 含 1 mmol/L EDTA) 冰浴匀浆 2 min。将匀浆液于 4℃ 10 000 r/min 条件下离心 10 min, 取上清液在 4℃ 12 000 r/min 条件下离心 30 min, 最后所得上清液作为酶源, 稀释 10 倍制备酶液。于比色皿中加入 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液 900 μL 、6 mmol/L GST 1 000 μL 和 1.2 mmol/L 的 CDNB 1 000 μL , 最后加入酶液 100 μL , 混匀, 27℃ 温育 5 min 后置于分光光度计 340 nm 波长下测定光密度值。

参考 Hansen 和 Hodgson (1971) 方法测定多功能氧化酶活性, 挑取 5 头 4 龄幼虫, 加入 1 100 μL 磷酸缓冲液 (0.1 mol/L、pH=7.8, 含 1 mmol/L EDTA、1 mmol/L DTT、1 mmol/L PTU 和 1 mmol/L PMSF) 冰浴匀浆 2 min。将匀浆液于 4℃ 10 000 r/min 条件下离心 10 min, 取上清液在 4℃ 12 000 r/min 条件下离心 30 min, 最后所得上清液作为酶源。于比色皿中加入 2 mmol/L 对硝基苯甲醚 2 000 μL , 9.6 mmol/L NADPH

100 μL 和酶液 900 μL , 混匀, 27 $^{\circ}\text{C}$ 温育 5 min 后置于分光光度计 405 nm 波长下测定光密度值。

1.7 蛋白质含量测定

采用 Bradford (1976) 考马斯亮蓝 G-250 法。称取 100 mg 考马斯亮蓝 G-250 加入到 50 mL 95% 乙醇中, 再加 100 mL 含量为 85% 的磷酸后用蒸馏水定容至 1 L 配制成考马斯亮蓝 G-250 染色液。称取 100 mg 牛血清白蛋白, 加入蒸馏水溶解, 定容至 100 mL 即为 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 的牛血清白蛋白标准溶液。准备 6 支干净试管, 依次加入牛血清白蛋白标准溶液 0、0.02、0.04、0.06、0.08 和 0.1 mL 后, 用蒸馏水定容至 1 mL, 每支试管中加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 染色液, 充分混匀放置 2 min 后, 在分光光度计 595 nm 波长下测定光密度值。酶蛋白测定时, 以酶液代替牛血清白蛋白标准溶液。以光密度值为纵坐标, 以蛋白质浓度为横坐标, 制作标准曲线。

1.8 增效试验

增效剂试验: 分别将增效剂胡椒基丁醚、磷酸三苯酯、顺丁烯二酸二乙酯与三氟甲吡醚按 2:1 配制成母液, 然后按照等比例方法, 用蒸馏水将母液稀释配制成 5 个系列质量浓度的药液备用, 其它操作同上述浸叶法。

1.9 数据分析

采用 SPSS17.0 软件进行统计分析, t -检验法进行差异显著性检验。抗性水平参考沈晋良等 (1991) 报道的标准划分: 敏感 ($RR < 3$)、敏感性降低 ($3 \leq RR < 5$)、低水平抗性 ($5 \leq RR < 10$)、中等水平抗性 ($10 \leq RR < 40$)、高水平抗性 ($40 \leq RR < 160$)、极高水平抗性 ($RR \geq 160$)。

2 结果与分析

2.1 小菜蛾对三氟甲吡醚抗性选育和抗性发展过程

利用群体汰选法在实验室内对小菜蛾相对敏感种群进行抗性选育, 结果见表 1。可以看出, 三氟甲吡醚对小菜蛾相对敏感品系的 LC_{50} 为

0.583 2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 经过连续筛选了 4 代后, 其 LC_{50} 值上升至 1.583 0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 抗性上升了 2.71 倍, 抗性发展缓慢上升; 但在第 5 代时抗性水平略微下降, 抗性倍数为 2.36。从第 6 代开始, 抗性又逐渐上升, 第 8-10 代, 小菜蛾对三氟甲吡醚的抗性稳中有升; 第 11 和 12 代, 小菜蛾对三氟甲吡醚的抗性上升明显, 第 13 代抗性略微下降, 但从第 14 代开始, 小菜蛾对三氟甲吡醚的抗性上升较快, 至第 18 代时, 其抗性倍数达 14.8 倍。

结合抗性水平分级标准对整个 18 代的抗性发展情况进行划分 (如图 1)。前 5 代 (F_1 - F_5) 小菜蛾种群对三氟甲吡醚保持平稳的敏感性状态。从 F_6 到 F_{10} 代, 敏感性被打破; 尽管 F_7 和 F_9 的抗性水平超过 5.1 倍, 但也仅为 5.14 倍和 5.55 倍, 呈现出波动的敏感性下降。再经过 4 代的低水平抗性阶段后, 群体进入中等水平抗性 (抗性倍数: 10.1-14.8)。

2.2 小菜蛾对三氟甲吡醚的抗性风险评估

根据每代抗性筛选时所得的毒力资料, 采用 Tabashnik 的阈性状分析方法 (Tabashnik and McGaughey, 1994) 计算抗性现实遗传力 h^2 ($h^2 = R/S$)。结果显示, 整个 18 代筛选, 其抗性现实遗传力 $h^2 = 0.1558$ 。根据不同筛选阶段的抗性现实遗传力值, 对小菜蛾对三氟甲吡醚的抗性风险进行预测。假设小菜蛾在三氟甲吡醚选育下的平均死亡率分别为 50%、60%、70%、80% 和 90% 时, 计算抗性提高 10 倍所需代数 (假设筛选前后毒力回归线的斜率为 2.0, 即 $\delta p = 0.5$, 该假设的斜率与筛选前后的斜率接近)。在三氟甲吡醚对小菜蛾的致死率分别为 50%、60%、70%、80% 和 90% 条件下, 当 $h^2 = 0.1558$ 时, 预计小菜蛾对三氟甲吡醚抗性增加 10 倍分别需要 16.1、13.2、11.0、9.2 和 7.3 代。

2.3 小菜蛾抗性品系和敏感品系的解毒酶活性

对小菜蛾三氟甲吡醚抗性品系和敏感品系的酯酶、多功能氧化酶和谷胱甘肽-S-转移酶活性进行测定 (表 2)。结果显示, 抗性品系 R 的酯酶比活力和多功能氧化酶比活力均显著高于敏感品系 S, 分别为敏感品系的 1.34 倍和 1.45 倍;

表 1 小菜蛾对三氟甲吡醚的抗性选育和抗性发展
Table 1 Insecticide selection and resistance development of *Plutella xylostella* against pyridalyl

汰选代数 Generations	毒力回归方程 Regression equation	LC ₅₀ (mg·L ⁻¹) (95%置信限) LC ₅₀ (mg·L ⁻¹) (95% F.L.)	抗性倍数 Resistance ratio
F ₀	Y = 5.453 7+1.937 2 x	0.583 2 (0.462 4-0.735 6)	1.0
F ₁	Y = 4.988 2+1.809 7 x	1.015 2 (0.792 1-1.301 1)	1.74
F ₂	Y = 4.801 6+1.532 2 x	1.347 3 (1.015 7-1.787 4)	2.31
F ₃	Y = 4.7453+1.379 7 x	1.529 7 (1.120 6-2.088 2)	2.62
F ₄	Y = 4.671 9+1.644 6 x	1.583 0 (1.209 8-2.071 2)	2.71
F ₅	Y = 4.763 6+1.712 1 x	1.374 2 (1.063 3-1.776 1)	2.36
F ₆	Y = 4.501 8+1.404 9 x	2.262 8 (1.664 9-3.075 2)	3.88
F ₇	Y = 4.216 1+1.644 6 x	2.996 7 (2.294 8-3.913 4)	5.14
F ₈	Y = 4.240 5+1.959 5 x	2.441 2 (1.941 1-3.070 1)	4.19
F ₉	Y = 4.280 4+1.409 7 x	3.239 2 (2.386 6-4.396 3)	5.55
F ₁₀	Y = 4.324 3+1.522 7 x	2.778 2 (2.093 2-3.687 5)	4.76
F ₁₁	Y = 3.9679+1.505 1 x	4.849 9 (3.628 0-6.483 3)	8.32
F ₁₂	Y = 3.7638+1.673 3 x	5.480 1 (4.200 9-7.148 6)	9.40
F ₁₃	Y = 3.935 4+1.752 4 x	4.050 7 (3.149 7-5.209 3)	6.95
F ₁₄	Y = 3.940 4+1.377 0 x	5.881 3 (4.302 0-8.040 4)	10.08
F ₁₅	Y = 3.696 2+1.543 7 x	6.992 2 (5.235 6-9.338 1)	11.99
F ₁₆	Y = 3.663 4+1.530 5 x	7.470 2 (5.630 2-9.911 4)	12.81
F ₁₇	Y = 3.657 2+1.386 6 x	9.297 9 (6.808 3-12.697 9)	15.94
F ₁₈	Y = 3.489 5+1.613 9 x	8.628 5 (6.585 2-11.305 9)	14.80

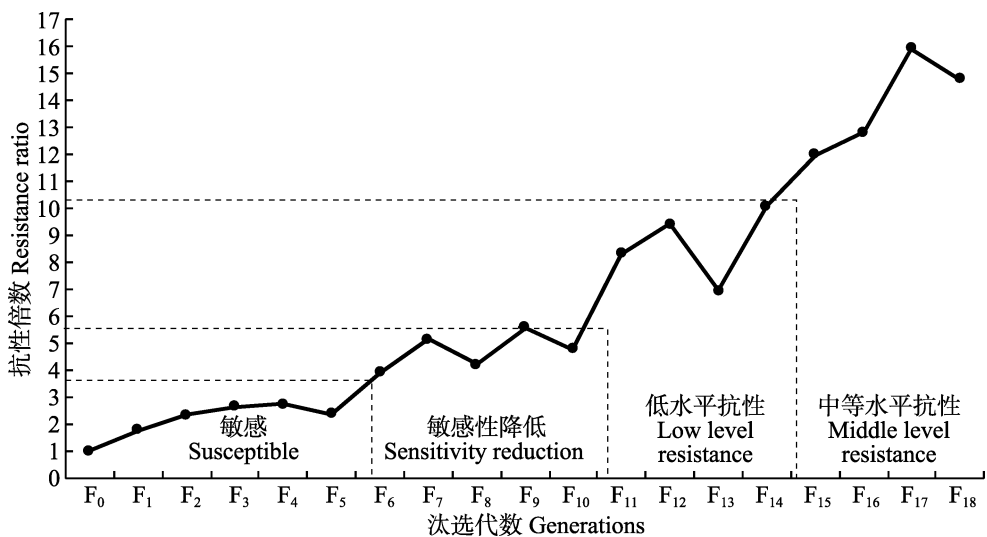


图 1 小菜蛾对三氟甲吡醚的抗性发展过程
Fig. 1 Resistance development of pyridalyl in *Plutella xylostella*

但两个品系的谷胱甘肽-S-转移酶比活力无显著差异。表明小菜蛾对三氟甲吡醚的抗性与其酯酶和多功能氧化酶活性的升高相关。

2.4 增效试验

在抗性品系 R 中 ,酯酶抑制剂磷酸三苯酯和多功能氧化酶抑制剂胡椒基丁醚对三氟甲吡醚

有明显增效作用, 增效倍数分别为 1.21 倍和 1.43 倍。谷胱甘肽-S-转移酶抑制剂顺丁烯二酸二乙酯对三氟甲吡醚没有明显增效作用。在敏感品系 S 中, 磷酸三苯酯和顺丁烯二酸二乙酯不但没有

增效作用, 反而降低了敏感小菜蛾品系对三氟甲吡醚的敏感性。推测酯酶和多功能氧化酶与小菜蛾对三氟甲吡醚的抗性有关, 该结果与酶活力测定结果一致 (表 3)。

表 2 小菜蛾三氟甲吡醚抗性和敏感品系的解毒酶活性 ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ protein}$)

Table 2 Comparison of detoxification enzyme activity between R and S strains of *Plutella xylostella* against pyridalyl

解毒酶 Detoxification enzyme	抗性品系 (R) Resistant strain	敏感品系 (S) Susceptible strain	比值 Ratio
酯酶 Esterase	0.59±0.02 a	0.44±0.11 b	1.34
多功能氧化酶 Mixed-functional oxidase	0.16±0.01 a	0.11±0.04 b	1.45
谷胱甘肽-S-转移酶 Glutathione S-transferase	0.70±0.05 a	0.66±0.05 a	1.06

表中数据为平均值±标准差。不同小写字母表示经 *t*-检验法在 $P<0.05$ 水平差异极显著。

Data in the table are mean ± SD, and followed by different letters indicate significant difference at $P<0.05$ level by *t*-test.

表 3 3 种增效剂对小菜蛾三氟甲吡醚抗性品系的增效作用

Table 3 Synergism of three synergists on resistant and susceptible strains of *Plutella xylostella* against pyridalyl

品系 Strain	药剂 Insecticide	LC ₅₀ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (95%置信限) LC ₅₀ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (95% F.L.)	毒力回归方程 Regression equation	增效比 Synergistic ratio
R (F ₁₈)	三氟甲吡醚 Pyridalyl	8.628 5 (6.585 2-11.305 9)	$Y=3.489\ 5+1.613\ 9\ x$	—
	三氟甲吡醚+磷酸三苯酯 Pyridalyl + TPP	7.132 6 (5.339 4-9.528 0)	$Y=3.735\ 9+1.481\ 6\ x$	1.21
	三氟甲吡醚+胡椒基丁醚 Pyridalyl + PBO	6.040 6 (4.566 4-7.990 6)	$Y=3.793\ 3+1.544\ 9\ x$	1.43
	三氟甲吡醚+顺丁烯二酸二乙酯 Pyridalyl + DEM	9.323 3 (6.599 1-13.172 1)	$Y=3.816\ 3+1.220\ 8\ x$	0.93
S	三氟甲吡醚 Pyridalyl	0.583 2 (0.462 4-0.735 6)	$Y=5.453\ 7+1.937\ 2\ x$	—
	三氟甲吡醚+磷酸三苯酯 Pyridalyl + TPP	0.744 4 (0.572 7-0.967 6)	$Y=5.216\ 5+1.688\ 5\ x$	0.78
	三氟甲吡醚+胡椒基丁醚 Pyridalyl + PBO	0.497 6 (0.378 0-0.655 1)	$Y=5.479\ 4+1.581\ 8\ x$	1.17
	三氟甲吡醚+顺丁烯二酸二乙酯 Pyridalyl + DEM	0.715 0 (0.526 6-0.970 9)	$Y=5.204\ 1+1.401\ 1\ x$	0.82

3 讨论

在害虫产生抗药性之前, 通过室内抗性筛选了解害虫的抗性形成规律对制定和实施预防性抗性治理具有重要意义。研究表明, 小菜蛾对于不同药剂的抗性发展速度和特点往往不同。贾变桃等 (2015) 用溴虫腈对采自山西太谷郊区的小菜蛾田间种群进行抗性筛选, 饲养 20 代期间共筛选 18 代, 抗性增长 48.2 倍, 达到了高水平抗性。朱剑翔等 (2007) 筛选了对多杀菌素抗性的小菜蛾品系, 该品系在 F₄ 代即显示出 11.4 倍的中等抗性, 前期抗性增长速度异常迅速; 在 F₂₂ 代达到 45.7 倍的高抗水平; 随后至 F₃₄ 代抗性达

到 60 倍。陈琼等 (2015) 用唑虫酰胺对小菜蛾进行了 26 代 24 次抗性选育, 抗性上升了 58.76 倍。在汰选初期 (F₀-F₁₃) 抗性发展缓慢, 抗性仅上升了 2.91 倍, 后期抗性发展较快, 在此基础上抗性又上升了 20.19 倍, 抗性发展趋势整体呈现先慢后快的特点。本筛选结果显示, 用三氟甲吡醚对小菜蛾筛选 18 代后, 其抗性仅增长了 14.8 倍。与小菜蛾对多杀菌素 (朱剑翔等, 2007) 和溴虫腈 (贾变桃等, 2015) 的抗性发展速度相比, 小菜蛾对三氟甲吡醚的抗性发展速度较缓慢。小菜蛾对不同药剂的抗性发展速度存在明显差异的原因是否与药剂的不同作用机理相关, 尚待进一步研究。

任何药剂在害虫明显产生抗性之前,有必要评估其产生抗药性的风险,为该药的科学使用提供依据。目前的抗性风险评估方法是根据抗性现实遗传力来预测害虫在一定选择压力下对药剂抗性发展的速率。梁延坡等(2010)的研究结果表明,小菜蛾对阿维菌素的抗性现实遗传力(h^2)为 0.130 3。在致死率为 50%-99%时,抗性上升 10 倍需要 2.4-15.9 代。陈琼等(2015)的研究结果表明,小菜蛾对唑虫酰胺的抗性现实遗传力为 0.167 2,假如斜率=2.0, $h^2=0.167 2$,群体死亡率为 50%-90%时,抗性上升 10 倍需 6.8-15.0 代。本研究结果表明,室内用三氟甲吡醚对小菜蛾进行 18 代筛选,小菜蛾对三氟甲吡醚的抗性现实遗传力 $h^2=0.155 8$ 。在三氟甲吡醚对小菜蛾的致死率分别为 50%-90%条件下,当 $h^2=0.155 8$ 时,预计小菜蛾对三氟甲吡醚抗性增加 10 倍分别需要 7.3-16.1 代,表明小菜蛾对三氟甲吡醚产生抗性的风险较大。由于在室内的抗性选育是处于一个相对稳定的封闭环境中进行,因此其环境方差要小于田间,估算的 h^2 可能比田间的实际值偏高。在田间条件下,小菜蛾种群受天敌、气候、抗性个体和敏感个体的交流以及交替用药或轮换用药等影响,使得抗性基因频率降低,导致田间小菜蛾种群对药剂的抗性发展速度往往更缓慢。虽然室内筛选的结果与田间实际情况之间有一定的差异,但其在一定程度上也反映了该药剂的基本特点,仍然可以为制定预防性的抗性治理策略提供理论依据。

目前,尚未明确三氟甲吡醚对害虫的作用机理,也未见有关害虫对三氟甲吡醚抗性机制的研究报道。大量研究表明,多功能氧化酶、酯酶和谷胱甘肽-S-转移酶是昆虫体内存在的 3 类重要解毒代谢酶,且这 3 类酶均为底物非常广泛的同工酶系,可对不同的化合物进行代谢反应。当杀虫剂进入虫体后,这些代谢酶通过对杀虫剂的转化和降解作用来降低杀虫剂的毒性。多功能氧化酶、酯酶和谷胱甘肽-S-转移酶的活性增强往往是导致害虫对杀虫剂产生抗性的重要原因(吴青君等,2001;Cui *et al.*,2015;Liu *et al.*,2015)。例如,任娜娜等(2015)对小菜蛾对氟虫腈的抗

性机制研究结果发现,羧酸酯酶抑制剂磷酸三苯酯可以削弱小菜蛾 3 龄幼虫对氟虫腈的抗性,使用较低剂量(LC_{30} 和 LC_{50})氟虫腈处理小菜蛾 3 龄幼虫后,处理组羧酸酯酶比活力明显高于对照,羧酸酯酶在小菜蛾对氟虫腈解毒代谢中具有重要作用。尹飞等(2016)的研究结果表明,谷胱甘肽-S-转移酶、羧酸酯酶和乙酰胆碱酯酶的酶活随着小菜蛾对乙基多杀菌素抗性的增强而增强。Hu 等(2014)的研究结果表明,代谢酶活性与小菜蛾对氯虫苯甲酰胺的抗性密切相关,且谷胱甘肽-S-转移酶在小菜蛾对氯虫苯甲酰胺的抗性中发挥了重要作用,多功能氧化酶和酯酶也有一定的作用。本文增效实验结果显示,在抗性品系中,酯酶抑制剂磷酸三苯酯和多功能氧化酶抑制剂胡椒基丁醚对三氟甲吡醚有明显增效作用,谷胱甘肽-S-转移酶抑制剂顺丁烯二酸二乙酯对三氟甲吡醚没有明显增效作用,推测酯酶和多功能氧化酶与小菜蛾对三氟甲吡醚的抗性有关。酶活力测定结果发现,抗性品系的酯酶比活力和多功能氧化酶比活力均显著高于敏感品系,但抗、感两个品系的谷胱甘肽 S 转移酶比活力之间无显著差异,表明小菜蛾对三氟甲吡醚的抗性与其酯酶和多功能氧化酶活性的升高相关。由于本研究中的抗性品系小菜蛾对三氟甲吡醚的抗性水平还比较低,抗性倍数仅为 14.8 倍,通过解毒酶抑制剂的增效试验和离体酶活力的测定仅初步探讨了其可能的生化机制。欲阐明小菜蛾对三氟甲吡醚产生抗性的内在机制,还有待达到高水平抗性后作进一步的研究,尤其是在分子水平上进行更深入系统的研究。

参考文献 (References)

- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Cui F, Li MX, Chang HJ, Mao Y, Zhang HY, Lu LX, Yan SG, Lang ML, Liu L, Qiao CL, 2015. Carboxylesterase-mediated insecticide resistance: Quantitative increase induces broader metabolic resistance than qualitative change. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121: 88-96.
- Chen Q, Chen JQ, Huang SJ, Chen HF, Qin WJ, Qin HG, 2015.

- Realized heritability and risk assessment of resistance of *Plutella xylostella* to toltenpyrad. *Jiangsu Journal of Agricultural Science*, 31(2): 267–271. [陈琼, 陈洁琼, 黄水金, 陈洪凡, 秦文婧, 秦厚国, 2015. 小菜蛾对唑虫酰胺的抗性现实遗传力及风险评价. *江苏农业学报*, 31(2): 267–271.]
- Furlong MJ, Wright DJ, Dosdall LM, 2013. Diamondback moth ecology and management: problems, progress, and prospects. *Annual Review of Entomology*, 58(1): 517–541.
- Hansen LG, Hodgson E, 1971. Biochemical characteristics of insect microsomes N- and O-demethylation. *Biochemical Pharmacology*, 20(7): 1569–1573.
- Han ZJ, Moores GD, Denholm I, Devonshire AL, 1998. Association between biochemical markers and insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 62(3): 164–171.
- Hu ZD, Feng X, Lin QS, Chen HY, Li ZY, Yin F, Liang P, Gao XW, 2014. Biochemical mechanism of chlorantraniliprole resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* Linnaeus. *Journal of Integrative Agriculture*, 13(11): 2452–2459.
- Isayama S, Saito S, Kuroda K, Umeda K, Kasamatsu K, 2005. Pyridalyl, a novel insecticide: potency and insecticidal selectivity. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 58(4): 226–233.
- Jia BT, Hong SS, Wang L, 2015. Selection, risk assessment and cross-resistance of resistance to chlorfenapyr in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Journal of Environmental Entomology*, 37(1): 90–95. [贾变桃, 洪珊珊, 王龙, 2015. 小菜蛾对溴虫腈抗性筛选、风险评估及交互抗性研究. *环境昆虫学报*, 37(1): 90–95.]
- Liang YP, Wu QJ, Zhang YJ, Xu BY, Xie SH, Ji XC, 2010. Risk assessment and cross-resistance of resistance to abamectin in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Journal of Tropical Organisms*, 1(3): 228–332. [梁延坡, 吴青君, 张友军, 徐宝云, 谢圣华, 吉训聪, 2010. 小菜蛾对阿维菌素的抗性风险评估及交互抗性的室内测定. *热带生物学报*, 1(3): 228–332.]
- Liu CX, Han ZJ, Li FL, Chen ZH, 1993. Study on the rearing of diamondback moth by vermiculite radish seedling. *Chinese Bulletin of Entomology*, 30(6): 341–344. [刘传秀, 韩招久, 李凤良, 陈之浩, 1993. 应用蛭石萝卜苗法室内继代大量繁殖小菜蛾的研究. *昆虫知识*, 30(6): 341–344.]
- Liu NN, Li M, Gong YH, Liu F, Li T, 2015. Cytochrome P450s-Their expression, regulation, and role in insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 120: 77–81.
- Li Z, Feng X, Liu SS, You M and Furlong MJ, 2016. Biology, ecology, and management of the diamondback moth in China. *Annual Review of Entomology*, 61: 277–96.
- Powell GF, Ward DA, Prescott MC, Spiller DG, White MR, Turner PC, Earley FG, Phillips J, Rees HH, 2011. The molecular action of the novel insecticide, pyridalyl. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(7): 459–69.
- Ren NN, Xie M, You YC, Li JY, Chen WJ, Cheng XM, You MS, 2015. Fipronil-resistance mediated by carboxylesterases in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Acta Entomologica Sinica*, 58(3): 288–296. [任娜娜, 谢苗, 尤燕春, 李建玉, 陈伟军, 程学敏, 尤民生, 2015. 羧酸酯酶介导的小菜蛾对氟虫腈的抗性. *昆虫学报*, 58(3): 288–296.]
- Shen JL, Tan JG, Xiao B, Tan FJ, You ZP, 1991. Monitoring and prediction of resistance to pyrethroids of cotton boll worm in China. *Chinese Bulletin of Entomology*, 28(6): 337–341. [沈晋良, 谭建国, 肖斌, 谭福杰, 尤子平, 1991. 我国棉铃虫对拟除虫菊酯类农药的抗性监测及预报. *昆虫知识*, 28(6): 337–341.]
- Sakamoto N, Saito S, Hirose T, Suzuki M, Matsuo S, Izumi K, Nagatomi T, Ikegami H, Umeda K, Tsushima K, Matsuo N, 2004. The discovery of pyridalyl: a novel insecticidal agent for controlling lepidopterous pests. *Pest Management Science*, 60: 25–34.
- Tabashnik BE, McGaughey WH, 1994. Resistance risk assessment for single and multiple insecticide: response of Indian meal moth (Lepidoptera: Pyralidae) to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology*, 87 (4): 834 – 841.
- 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. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 82(1): 79–93.
- Wu QJ, Zhang WJ, Zhang YJ, Xu BY, Zhu GR, 2001. The role of detoxification in abamectin resistant *Plutella xylostella* (L.). *Chinese Journal of Pesticide Science*, 3(3): 23–28. [吴青君, 张文吉, 张友军, 徐宝云, 朱国仁, 2001. 解毒酶系在小菜蛾对阿维菌素抗性中的作用. *农药学报*, 3(3): 23–28.]
- Xu WP, 2006. Pyridalyl: Novel pesticide to control lepidoptera pests. *World Pesticides*, 28(1): 51–53. [徐文平, 2006. 啉虫丙醚: 防治鳞翅目害虫的新颖杀虫剂. *世界农药* 28(1): 51–53.]
- Yin F, Chen HY, Feng X, Hu ZD, Lin QS, Li ZY, Bao HL, 2016. The role of detoxifying enzymes in the resistance of *Plutella xylostella* to spinetoram. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 53(2): 314–319. [尹飞, 陈焕瑜, 冯夏, 胡珍娣, 林庆胜, 李振宇, 包华理, 2016. 乙基多杀菌素抗性小菜蛾代谢解毒酶活性研究. *应用昆虫学报*, 53(2): 314–319.]
- Zhu JX, Wu SW, Yang YH, Wu YD, 2007. Laboratory selection and inheritance mode of resistance to spinosad in the diamond back moth, *Plutella xylostella*. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 37(1): 61–65. [朱剑翔, 武淑文, 杨亦桦, 吴益东, 2007. 小菜蛾对多杀菌素的抗性筛选及遗传方式分析. *南京农业大学学报*, 37(1): 90–95.]
- Zhou L, Huang J and Xu H, 2011. Monitoring resistance of field populations of diamondback moth *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae) to five insecticides in South China: A ten-year case study. *Crop Protection*, 30(3): 272–278.
- Zhou XR, Chang J, Pang BP, Wu QJ, Zhang YJ, 2013. Population dynamics and insecticide resistance of *Plutella xylostella* in Inner Mongolia. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(1): 173–179. [周晓榕, 常静, 庞保平, 吴青君, 张友军, 2013. 内蒙古小菜蛾种群数量动态及抗药性监测. *应用昆虫学报*, 50(1): 173–179.]