研究论文

抗丁醚脲二斑叶螨种群筛选及生化抗性机理初探*

叶调琴** 杨顺义*** 李文平

（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】** 探究二斑叶螨 *Tetranychus urticae* 对丁醚脲的抗性发展情况及生化抗性机理，以期为二斑叶螨的抗药性治理提供理论依据。**【方法】** 采用室内生物测定，用丁醚脲对二斑叶螨进行持续抗性选育 33 代；用生化分析方法，每隔 6 代测定二斑叶螨丁醚脲抗性种群羧酸酯酶（Carboxylesterase，CarEs）、谷胱甘肽 *S*-转移酶（Glutathione *S*-transferase，GSTs）、多功能氧化酶（Mixed-function oxidases，MFOs）和几丁质酶（Chitinases）的活力变化情况。**【结果】** 二斑叶螨经丁醚脲汰选至 33 代时，抗性指数达到 18.610 倍；抗性种群体内 CarEs、GSTs 和 MFOs 活性较敏感种群显著提高（$P < 0.05$），其相对倍数分别为 1.909、2.119 和 7.436 倍，同时几丁质酶的活性较敏感种群无显著差异（$P > 0.05$），其相对倍数为 0.594。**【结论】** 二斑叶螨对丁醚脲的抗性主要与 MFOs 活性升高和几丁质酶活性降低有关，其次，GSTs 和 CarEs 活性升高也参与了丁醚脲抗性的形成。

关键词 二斑叶螨；丁醚脲；抗性培育；解毒酶；几丁质酶

Screening of *Tetranychus urticae* populations for resistance to diafenthiuron and the mechanism of biochemical resistance to this pesticide

YE Tiao-Qin** YANG Shun-Yi*** LI Wen-Ping

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

Abstract **[Aim]** To investigate the development of resistance to diafenthiuron and the mechanism responsible for this resistance, in *Tetranychus urticae*. **[Methods]** A susceptible population of *T. urticae* was continuously selected for resistance to diafenthiuron for 33 generations in a laboratory. The activity of carboxylesterases (CarEs), glutathione *S*-transferases (GSTs), Mixed-function oxidases (MFOs) and chitinases (chitinases) in this population was tested every six generations. **[Results]** The resistance index had reached 18.61 after 33 generations. The activity of CarEs, GSTs and MFOs in the resistant population were significantly higher (1.909, 2.119 and 7.436-fold, respectively) than in the sensitive population ($P < 0.05$). However, there was no significant difference in the chitinase activity in the sensitive populations (0.594, $P < 0.05$). **[Conclusion]** Resistance of *T. urticae* to diafenthiuron is mainly associated with MFOs and chitinase activity, although GSTs and CarEs also play a role.

Key words *Tetranychus urticae*; diafenthiuron; resistance breeding; detoxification enzyme; chitinase

*资助项目 Supported project：甘肃农业大学学科建设基金（GAU-XKJS-2018-07）

**第一作者 First author，E-mail：1400492482@qq.com

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

收稿日期 Received：2023-01-15；接受日期 Accepted：2023-04-08

二斑叶螨 *Tetranychus urticae* 属蛛形纲 Arachnida、蜱螨亚纲 Acari、真螨目 Acariformes、叶螨科 Tetranychidae，是一种重要的农业害螨，为害果树、蔬菜等超过 140 科 1 100 多种植物，甚至能取食包括一些能产生有毒化合物的植物，是温室生产和大田作物上的重要害螨（Grbic *et al.*，2011；杨顺义，2014）。该螨世代周期短、繁殖力高、产雄孤雌生殖且越冬场所广泛，导致其可在短期内对化学药剂产生较高的抗药性（Stumpf and Nauen，2002；Ay and Gürkan，2005），使得叶螨为害更加猖獗（Van Leeuwen *et al.*，2010；刘庆娟等，2011；付社岗，2015）。

丁醚脲是一种硫脲类高效杀虫、杀螨剂，具有独特的杀虫机理，属于线粒体 ATP 酶抑制剂，其在紫外光及虫体多功能氧化酶（Mixed-function oxidases，MFOs）作用下，作用于昆虫的神经系统，影响其能量转换和呼吸作用，使昆虫神经系统不能正常运转，致使昆虫僵死（付凯，2019）。目前，丁醚脲是防治小菜蛾 *Plutella xylostella* 和茶小绿叶蝉 *Empoasca onukii* 等害虫及害螨的重要药剂之一，国内的小菜蛾对丁醚脲处于低抗水平（徐巨龙等，2021）。胡晓斌等（2015）研究表明芜湖地区丁醚脲防治甘蓝小菜蛾防效高达 96.20%。但朱砂叶螨 *T. cinnabarinus* 等作物害螨对丁醚脲处于高抗水平，如昆明鲜切花产区的朱砂叶螨对丁醚脲的抗性指数达到 21.10 倍（罗雁婕等，2012；杨振国等，2022）。韩鹏杰等（2011）研究发现丁醚脲对山楂叶螨 *T. viennensis* 3-10 d 的防效高达 97.00%以上。因此，明确叶螨类的抗药性机理，抗性发展速度和规律，对延长丁醚脲的使用寿命具有重要意义。

昆虫及害螨生化抗性机理研究报道较多。刘庆娟等（2011）研究发现螨类产生抗药性主要与体内解毒酶的代谢作用增强、昆虫体壁穿透作用降低和虫体靶标部位敏感度降低等有关。高新菊等（2012）研究表明二斑叶螨对四螨嗪产生抗性主要与 MFOs 有关，其次是 CarEs 和 GSTs；截形叶螨 *T. truncatctus* 对哒螨灵产生抗性可能与提高体内 3 种解毒酶 CarEs，GSTs 和 MFOs 与底物的亲和力和增强代谢能力有关（宋丽雯等，2014）；二斑叶螨对溴虫腈产生抗药性与降低螨体壁穿透性和增强 GSTs 及 CarEs 对药剂的代谢作用有关（李瑞娟等，2005）。

几丁质酶是昆虫蜕皮过程中重要的代谢酶，其代谢会随着昆虫不同阶段的生长发育其代谢会发生变化，对昆虫的正常生长发育起至关重要的作用(何磊，2019)。几丁质酶活性的大小影响螨的生长发育，几丁质酶活性降低或升高到一定水平时，会影响螨的正常生长（王丹等，2016）。目前，对二斑叶螨抗丁醚脲种群解毒酶和几丁质酶活力变化的研究未见报道。因此，本研究结合二斑叶螨抗丁醚脲种群汰选过程，测定不同抗性水平种群雌成螨体内 CarEs、GSTs 和 MFOs 三大解毒酶系以及几丁质酶的活力，通过抗性种群与敏感种群酶活力的比较，分析三大解毒酶系及几丁质酶在二斑叶螨抗性产生过程中的作用，初步明确二斑叶螨对丁醚脲产生抗性的生化机理，为预防和延缓二斑叶螨抗性发展和抗性治理提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　供试生物材料

供试二斑叶螨敏感种群（S）：二斑叶螨敏感种群自 2007 年 6 月底于兴隆山自然保护区采样后在甘肃农业大学植物保护专业养虫室采用雌雄单系（一雌一雄）饲养而成，2019 年 6 月分出部分个体于甘肃农业大学植物保护学院农药学实验室连续培养多代，在室温（25±1）℃，相对湿度 65%±5%，光周期 16L∶8D 条件下，用盆栽豇豆 *Vigna unguiculata* 苗饲养，期间不接触任何药剂。

1.2　供试药剂和试剂盒

96%丁醚脲原药（东莞市瑞德丰生物科技有限公司）、500 g/L 丁醚脲悬浮剂（东莞市瑞德丰生物科技有限公司）、毒扁豆碱（北京生物有限公司）、固蓝 B 盐（北京生物有限公司）、

十二烷基磺酸钠（北京广达恒益）、α-醋酸萘酯（天津市光复精细化工研究所）、α-萘酚（天津市光复精细化工研究所）、2，4-二硝基氯苯（Sigma）、还原性谷胱甘肽（北京广达恒益）、乙二胺四乙酸（北京广达恒益）、对硝基苯甲醚（河北恒业精细化工有限公司）、对硝基苯酚（山东淄博化学试剂厂）、牛血清白蛋白（北京广达恒益）、考马斯亮蓝（G-250）（北京广达恒益）、还原型辅酶Ⅱ四钠（北京拜尔迪生物公司）、几丁质酶活性检测试剂盒（北京索莱宝科技有限公司）。

1.3 试验方法

1.3.1 二斑叶螨抗性种群的选育 采用群体用药汰选方法选育二斑叶螨抗性种群，从敏感种群（S）中分离出部分个体为 F_0 代，接种到新鲜豇豆苗上，当种群个体达到一定密度时，从 F_0 至 F_{33} 代，选用每代均能杀死种群 50%左右个体的丁醚脲浓度（LC_{50}）作为选择压力，进行喷雾处理，液滴要均匀喷于植株上以及叶片的正反面。待同一代卵发育为成熟个体时再一次喷药，种群恢复到足够大时再进行下次喷药处理，直到选育出抗性种群。

1.3.2 生物测定方法 使用玻片浸渍法进行生测（Dittrich *et al.*，1980；孟和生等，2000；范晓培等，2019；叶调琴等，2020）。取 1.5 cm 长的双面胶带（1.0 cm 宽），贴在载玻片的一端后揭去双面胶上的纸片，用细毛笔挑取行动活泼的雌成螨，将其背部粘在胶带上（不能粘住螨足、螨须和口器），每片粘 35 头，分成 4 行。在温度（25±1）℃，相对湿度为 65%±5%，光周期 16L：8D 的智能人工气候箱（JXM-1008B，宁波江南仪器厂）中放置 1 h 后观察，去除死亡和不活泼个体，保留 30 头。称取 1 g 丁醚脲原药并用 1 000 mL 的丙酮溶解成浓度为 1 000 mg/L 的母液，分别加蒸馏水稀释为 5 个不同的浓度（2、1、0.67、0.5 和 0.4 mg/L），将一端带螨的载玻片浸入药液中，轻轻摇动 5 s 后取出，用滤纸吸干多余的药液，将载玻片置于智能人工气候箱中（条件同上），24 h 后用双目镜检查结果，被细毛笔尖轻触螨体，螨头与螨足不动者即为死亡。试验每个浓度重复 3 次，以蒸馏水处理作为对照。

1.3.3 酶活测定方法

1.3.3.1 酶液制备

1.3.3.1.1 解毒酶系酶液制备 参考 Bradford（1976）的方法制备酶液，用零号毛笔挑取敏感种群和抗丁醚脲种群二斑叶螨雌成螨各 600 头，平均分装于 3 个 1.5 mL 离心管中，每管各加入 0.04 mol/L pH 7.0 磷酸缓冲液、66 mmol/L pH 7.0 磷酸缓冲液和 0.1 mol/L pH 7.8 磷酸缓冲液 1.5 mL，于冰水浴中用研磨棒仔细研磨，在 10 000 r/min，4 ℃下离心 15 min，取上清液得到羧酸酯酶（CarEs）、谷胱甘肽 *S*-转移酶（GSTs）和多功能氧化酶（MFOs）酶液备用。

1.3.3.1.2 几丁质酶液制备 按照几丁质酶活性检测试剂盒提供方法操作。用零号毛笔各挑取敏感种群与抗丁醚脲种群的二斑叶螨雌成螨 200 头，每 1.5 mL 离心管装入 100 头雌成螨，加入 1.5 mL 提取液，冰浴研磨后，10 000 r/min，4 ℃，离心 20 min，取上清液置于冰上待检。

1.3.3.2 酶源蛋白含量与酶比活力测定 酶源蛋白含量测定参考 Bradford（1976）的方法。取新酶标板，取 0.5 mL 酶液，加 2 mL 考马斯亮蓝染色液，置于水浴锅在 37 ℃下反应 10 min 后，在 595 nm 处测 OD 值为 A_0，分别以 0.04 mol/L pH 7.0 磷酸缓冲液、66 mmol/L，pH 7.0 磷酸缓冲液和 0.1 mol/L pH 7.8 磷酸缓冲液作空白对照，所测 OD 值为 A_1，所得 OD 值之差为 $A=A_0-A_1$。根据牛血清蛋白标准曲线，计算酶源蛋白含量；每处理重复 3 次。

羧酸酯酶（CarEs）比活力测定参考 Van Asperen（1962）方法。取 120 μL 酶液与 600 μL 反应混合液（含 3×10^{-4} mol/L α-醋酸萘酯，1×10^{-4} mol/L 毒扁豆碱和 0.04 mol/L pH7.0 磷酸缓冲液），30 ℃下水浴反应 30 min 后，加入 120 μL 显色剂（含 1%固蓝 B 盐与 5%十二烷基硫酸钠，其体积比为 2∶5），继续反应 30 min 显色，在 600 nm 处测 OD 值为 A_0，以磷酸缓冲液作空白对照，所测 OD 值为 A_1，以酶量（μL）作 X 轴，所得 OD 值差（$A=A_0-A_1$）作 Y 轴，绘制

标准曲线，并计算出羧酸酯酶比活力[μmol/（μg·min）]，每处理重复 3 次。

谷胱甘肽 *S*-转移酶（GSTs）比活力测定参考（Clark *et al.*，1984）方法并加以改进。以 0.05 mL 2，4-二硝基氯苯 CDNB（0.03 mol/L）作底物，依次加入 1.2 mL 磷酸缓冲液（66 mmol/L，pH 7.0）、0.15 mL 谷胱甘肽（50 mmol/L）和 0.1 mL 酶液混合，立即在 27 ℃下，340 nm 处连续测定 5 min 内 OD 值，以磷酸缓冲液作空白对照；计算出谷胱甘肽 *S*-转移酶比活力[μmoL/(μg·min)]，每处理重复 3 次。

多功能氧化酶（MFOs）比活力测定参考（Hansen and Hodgson，1971；高新菊和沈慧敏，2011）方法并加以改进。取 1 mL 酶液，依次加入 1 mL 对硝基苯甲醚（4×10^{-3} mol/L）、0.2 mL NADPH（0.5×10^{-3} mol/L）和 0.8 mL 磷酸缓冲液（0.1 mol/L，pH 7.8）后混匀，以不加入酶液的作为对照，将离心管放于 37 ℃恒温水浴震荡反应 30 min 后，加入 1 mL HCl（1 mol/L）终止该反应，再加入 5 mL 氯仿进行萃取，静置 10 min 后，另取新离心管准确移取氯仿层 3 mL，再加入 3 mL NaOH（0.5 mol/L）进行萃取，静置 10 min 后，取水相层溶液 2 mL，在 400 nm 处测 OD 值；根据对硝基苯酚标准曲线，计算出多功能氧化酶比活力[μmoL/(μg·min)]，每处理重复 3 次。

几丁质酶活性测定按照几丁质酶活性检测试剂盒提供方法操作。测定管：取 2 个 1.5 mL 离心管，分别加入 100 μL 待测酶液和试剂一混匀，37 ℃恒温水浴反应 1 h 后，再沸水浴反应 5 min，于 8 000 r/min 下 25 ℃离心 10 min，分别取上清液 160 μL 置于新离心管中，再加入 40 μL 试剂二混匀，沸水浴反应 10 min，立即置于冰上待室温时，在 540 nm 处测 OD 值，记为 A 测定；对照管：加入 100 μL 待测酶液和试剂一混匀，37 ℃恒温水浴反应 1 h 后，再沸水浴反应 5 min，加入 100 μL 试剂一溶液，于 8 000 r/min 下 25 ℃离心 10 min，分别取上清液 160 μL 置于新离心管中，再加入 40 μL 试剂二混匀，沸水浴反应 10 min，立即置于冰上待室温时，在 540 nm 处测 OD 值，记为 A 对照，所测 OD 值之差 $A= A_{测定} - A_{对照}$。根据 N-乙酰氨基葡萄糖标准曲线，计算出几丁质酶活（U/mg）；每处理重复 3 次。

1.3.4　数据处理　在毒力测定时，对照组二斑叶螨的死亡率应控制在 10%以下，否则需重做生物测定。生测数据分析采用 SPSS 20.0 软件，求毒力回归方程（Y=a+bx）、致死中浓度 LC_{50} 和 LC_{50} 值的 95%置信限，并与敏感种群进行比较，求出抗性指数（RI）。不同解毒酶数据处理，用 Excel 软件进行统计分析，差异显著性分析采用单因素方差分析 Duncan 氏新复极差法。抗性指数计算公式如下：

$$\text{抗性指数}=\frac{\text{抗性种群}LC_{50}}{\text{敏感种群}LC_{50}}。$$

2　结果与分析

2.1　二斑叶螨对丁醚脲的抗性选育结果

由图 1 可以看出，在丁醚脲的选择压力下敏感种群二斑叶螨对丁醚脲的抗性指数随着选育代数的增加而逐渐升高，持续筛选 33 代后，二斑叶螨对丁醚脲的 LC_{50} 值从 0.036 g/L 上升至 0.670 g/L，相对抗性指数增长了 18.61 倍；虽然在前期选育阶段二斑叶螨对丁醚脲的抗性增长缓慢，但持续汰选 30 代后二斑叶螨的抗性指数增幅较大，且从整体抗性发展趋势来看，随着汰选代数的增加，二斑叶螨对丁醚脲的抗性持续增高。

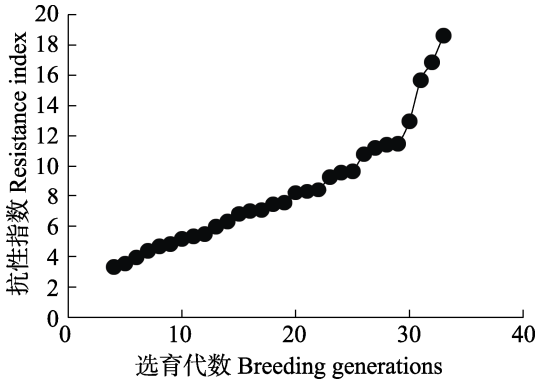

图 1　二斑叶螨对丁醚脲的抗性选育

Fig. 1　Selection of *Tetranychus urticae* resistance to diafenthiuron

2.2 酶活性测定结果

2.2.1 羧酸酯酶（CarEs）活性测定结果 由表 1 可知，随着抗丁醚脲种群筛选代数增加，二斑叶螨抗性种群的羧酸酯酶（CarEs）活性逐渐增加。药剂持续汰选 6 代后，抗性种群的羧酸酯酶（CarEs）活性均显著高于 F_0 代（$P < 0.05$）。筛选到第 33 代时，二斑叶螨抗丁醚脲种群的羧酸酯酶（CarEs）活力是 F_0 代的 1.909 倍，差异显著（$P < 0.05$）。

表 1 二斑叶螨抗丁醚脲不同汰选世代羧酸酯酶（CarEs）的比活力变化

Table 1 The activities of CarEs in different selection generations of *Tetranychus urticae*

世代 Generation	羧酸酯酶（CarEs）活性 [μmol/(μg·min)] Carboxylesterase activity [μmol/(μg·min)]	相对倍数 Multiples relative
F_0	0.002 20±0.000 08 e	1.000
F_6	0.002 21±0.000 04 e	1.005
F_{12}	0.002 45±0.000 04 d	1.114
F_{18}	0.002 96±0.000 05 c	1.345
F_{24}	0.003 68±0.000 03 b	1.673
F_{33}	0.004 20±0.000 08 a	1.909

表中数值为平均值±标准误，同一列数据后不同字母表示显著差异（$P < 0.05$，Duncan 氏新复极差法检验）。下表同。

Data are presented as mean±SE, and followed by the different letters within a column indicate significant difference ($P < 0.05$, Duncan's multiple range test). The same below.

2.2.2 谷胱甘肽 *S*-转移酶（GSTs）活性测定结果 由表 2 可知，经过药剂的持续 33 代选育，二斑叶螨抗性种群的谷胱甘肽 *S*-转移酶（GSTs）活性整体变化不大；抗性种群第 33 代时，抗性种群谷胱甘肽 *S*-转移酶（GSTs）的活力为敏感种群活力的 2.119 倍，差异显著（$P < 0.05$）。

2.2.3 多功能氧化酶（MFOs）活性测定结果 由表 3 可知，在药剂的选择压力下，二斑叶螨多功能氧化酶（MFOs）活性总体变化较大，抗性种群第 33 代的多功能氧化酶（MFOs）的活性为第 F_0 代的 7.436 倍，差异显著（$P < 0.05$）。

表 2 二斑叶螨抗丁醚脲不同汰选世代谷胱甘肽 *S*-转移酶（GSTs）的比活力变化

Table 2 The activities of GSTs in different selection generations of *Tetranychus urticae*

世代 Generation	谷胱甘肽 *S*-转移酶（GSTs）活性 [μmol/(μg·min)] Glutathione *S*-transferase activity [μmol/(μg·min)]	相对倍数 Multiples relative
F_0	35.512±1.248 d	1.000
F_6	35.685±0.412 d	1.005
F_{12}	39.783±3.435 e	1.120
F_{18}	48.696±0.289 c	1.371
F_{24}	57.613±1.662 b	1.622
F_{33}	75.247±1.244 a	2.119

表 3 二斑叶螨抗丁醚脲不同汰选世代多功能氧化酶（MFOs）的比活力变化

Table 3 The activities of MFOs in different selection generations of *Tetranychus urticae*

世代 Generation	多功能氧化酶（MFOs）活性 [μmol/(μg·min)] Multifunctional oxidase activity [μmol/(μg·min)]	相对倍数 Multiples relative
F_0	0.000 39±0.000 004 e	1.000
F_6	0.001 14±0.000 290 d	2.923
F_{12}	0.001 24±0.000 047 cd	3.179
F_{18}	0.001 48±0.000 187 c	3.795
F_{24}	0.001 84±0.000 046 b	4.718
F_{33}	0.002 90±0.000 144 a	7.436

2.2.4 几丁质酶活性测定结果 由表 4 可知，在药剂汰选过程中，二斑叶螨几丁质酶的酶活随着汰选代数增加出现先升高后降低的趋势。从敏感种群 F_0 代到抗性种群的第 6 代几丁质酶活性升高，表明二斑叶螨对丁醚脲具有一定的敏感性，而抗性种群第 6 代至第 33 代的几丁质酶比活力逐渐降低，且抗性种群第 6 代几丁质酶的比活力显著高于第 33 代（$P < 0.05$）。

表 4　二斑叶螨抗丁醚脲不同汰选世代几丁质酶的比活力变化

Table 4　The activities of chitinase in different selection generations of *Tetranychus urticae*

世代 Generation	几丁质酶活性 (U/mg) Chitinase activity (U/mg)	相对倍数 Multiples relative
F_0	0.000 490±0.000 17 ab	1.000
F_6	0.001 193±0.000 17 a	2.435
F_{12}	0.001 192±0.000 17 a	2.433
F_{18}	0.000 993±0.000 80 ab	2.027
F_{24}	0.000 692±0.000 61 ab	1.412
F_{33}	0.000 291±0.000 35 b	0.594

3　结论与讨论

本文通过对二斑叶螨抗丁醚脲种群连续 33 代的选育，二斑叶螨对丁醚脲的抗性指数达 18.61 倍。从汰选过程中抗性种群抗性水平的变化来看，二斑叶螨对丁醚脲的抗性上升可分为稳定增长、波动式增长和快速上升 3 个阶段；F_0-F_4 可能由于螨刚接触药剂且施药浓度较低抗性发展缓慢，因此到 F_4 代才开始测定 LC_{50} 值；F_4-F_{19} 阶段由于抗药性的产生需要一定的时间来适应，所以抗性增长缓慢且稳定；F_{19}-F_{29} 阶段由于长期喷药使得药剂残效过高导致，抗性增长出现波动，抗性动态与叶螨对杀螨剂产生抗性趋势一致。通过对二斑叶螨抗丁醚脲种群解毒酶与几丁质酶活性分析，表明二斑叶螨对丁醚脲产生抗性主要与体内 MFOs 活性增强和几丁质酶活性降低有关，GSTs 和 CarE 也参与了抗性的形成，这与前人研究结果一致（段辛乐等，2011；高新菊等，2012；宋丽雯等，2014）。

目前，对于二斑叶螨对丁醚脲的抗性选育报道很少，但其他种类杀虫、杀螨剂对二斑叶螨的抗性研究较多，通过抗性选育研究显示，经过一段时间药剂汰选，二斑叶螨对杀螨药剂会产生明显抗性。比如王兴全等(2009)、张志刚等(2011)、田如海等（2012）和沈一凡等（2014）研究发现使用甲氰菊酯、螺螨酯和阿维菌素对二斑叶螨敏感种群持续汰选一定的代数后，可导致二斑叶螨对甲氰菊酯、螺螨酯和阿维菌素等产生了不同程度的抗药性，且在高强度药剂下继续筛选，抗性将会继续上升；但由于不同药剂的作用机理不同，导致二斑叶螨对药剂的抗性的发展速度有一定的差异。

近几年对于化学药剂类杀螨剂抗性机制研究较多，多数研究发现多功能氧化酶已经在一些昆虫体内对许多杀虫剂均产生了抗性，对药剂中杀虫化合物也产生了多种类型的催化反应，在杀虫剂的解毒代谢中起着重要作用。本试验酶比活力测定结果表明，相对二斑叶螨敏感种群，抗性种群 F_6、F_{12}、F_{18}、F_{24} 和 F_{33} 代 CarE、GSTs 及 MFOs 比活力都有明显升高（$P < 0.05$），且抗性种群 F_{33} 代 CarE、GSTs 及 MFOs 比活力分别为敏感种群的 1.909、2.119 和 7.436 倍，说明 CarE、GSTs 及 MFOs 活性的增强与二斑叶螨对丁醚脲抗药性的形成有关，其中 MFOs 起主要作用。如张征田等（2007）研究结果表明酯酶和多功能氧化酶-O-脱甲基活性的增强导致棉田草间钻头蛛 *Hylyphantes graminicola* 种群对拟除虫菊酯类杀虫剂抗性产生；吕娟娟（2013）研究发现二斑叶螨对螺螨酯抗性与 CarE、GSTs 及 MFOs 活性有关；杨顺义（2014）研究发现二斑叶螨对阿维菌素和螺虫乙酯产生抗性主要是 MFOs 活力增强的原因；沈一凡等（2014）对二斑叶螨敏感品系和抗阿维菌素品系解毒酶活性的分析发现 MFOs 的活性显著上升，说明二斑叶螨对阿维菌素的抗性增高与 MFOs 活性升高有关，本试验结果与上述报道研究结果一致。二斑叶螨抗丁醚脲种群的几丁质酶活性从 F_0 代 0.00 049 U/mg 升高到 F_6 代 0.001 192 U/mg，说明螨刚接触药剂需要一定的适应时间，F_6 代到 F_{33} 代，酶活下降到 0.000 291 U/mg，说明几丁质酶活性变化与二斑叶螨抗性形成有关。如王增霞等（2023）研究发现虱螨脲可降低草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 幼虫体内几丁质酶的活性而表现出较强的毒性作用；Khajuria 等（2010）研究结果表明欧洲玉米螟几丁质酶（*O. nubilalis* chitinase，OsCHIT）被沉默后使幼虫无法正常发育从而死亡；Xia 等（2016）研究发现柑橘全爪螨几丁质酶 1（*P. citri* chitinase 1，PcCHIT1）转

录被干扰后，严重影响幼虫蜕皮。

综上所述，二斑叶螨对丁醚脲的抗性增高且增长较快，同时，抗性的升高主要与 MFOs 的活性增强和几丁质酶活性的降低有关，其次为 GSTs 和 CarE。但试验仅测定了叶螨抗药性发展规律和生化机理，明确二斑叶螨对丁醚脲的抗性机理尚需进行更深入的研究。

参考文献 (References)

Ay R, Gürkan MO, 2005. Resistance to bifenthrin and resistance mechanisms of different strains of the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) from Turkey. *Phytoparasitica*, 33(3): 237–244.

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(1/2): 248–254.

Clark AG, Dick GL, Smith JN, 1984. Kinetic studies on a glutathione *S*-transferase from the larvae of *Costelytra zealandica*. *The Biochemical Journal*, 217(1): 51–58.

Dittrich V, Cranham J, Jepson L, Helle W, 1980. Revised method for spider mites and their eggs (eg *Tetranychus* spp. and *Panonychus ulmi* Koch), FAO method No. 10a. FAO Plant Production and Protection Paper. 49–53.

Duan XL, Zhang ZG, Gao XJ, Shen HM, 2011. Breeding of resistance of *Tetranychus urticaria* to cypermethrin and spirodifen and synergistic effect of synergist. *Plant Protection*, 37(5): 106–109. [段辛乐, 张志刚, 高新菊, 沈慧敏, 2011. 二斑叶螨对甲氰菊酯和螺螨酯的抗性选育及增效剂的增效作用. 植物保护, 37(5): 106–109.]

Fan XP, Yu ZJ, Tian XQ, Wang QW, Zhang Y, 2019. Determination of resistance of *Tetranychus cinnabarinus* to 5 acaricides. *Shanxi Agricultural Science*, 65(1): 8–10. [范晓培, 余正军, 田喜庆, 王清文, 张勇, 2019. 朱砂叶螨对 5 种杀螨剂的抗药性测定. 陕西农业科学, 65(11): 8–10.]

Fu K, 2019. Determination of butylurea and its two metabolites residues in cabbage by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *World Pesticides*, 41(2): 57–60, 64. [付凯, 2019. 超高效液相色谱串联质谱法测定甘蓝中丁醚脲及其 2 种代谢产物残留量. 世界农药, 41(2): 57–60, 64.]

Fu SG, 2015. Occurrence and control of *Tetranychus urticae* on pear trees. *Hebei Fruits*, 2015(4): 43. [付社岗, 2015. 二斑叶螨在梨树上的发生和防治. 河北果树, 2015(4): 43.]

Gao XJ, Shen HM, 2011. Resistance selection with fenropathrin and the change of detoxification enzyme activities in *Tetranychus urticae* Koch. *Acta Entomologica Sinica*, 54(1): 64–69.[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.]

Gao XJ, Zhang ZG, Duan XL, Shen HM, 2012. Screening of tetramitezine-resistant strains and changes in their detoxification enzyme activity. *Chinese Journal of Agricultural Sciences*, 45(7): 1432–1438. [高新菊, 张志刚, 段辛乐, 沈慧敏, 2012. 二斑叶螨抗四螨嗪品系筛选及其解毒酶活力变化.中国农业科学, 45(7): 1432–1438.]

Grbic M, Van Leeuwen T, Clark RM, Rombauts S, Rouze P, Grbic V, Osborne EJ, Dermauw W, Phuong CTN, Ortego F, Hernandez-Crespo P, Diaz I, Martinez M, Navajas M, Sucena E, Magalhaes S, Nagy L, Pace RM, Djuranovic S, Smagghe G, Iga M, Christiaens O, Veenstra JA, Ewer J, Villalobos RM, Hutter JL, Hudson SD, Velez M, Yi SV, Zeng J, Pires-daSilva A, Roch F, Cazaux M, Navarro M, Zhurov V, Acevedo G, Bjelica A, Fawcett JA, Bonnet E, Martens C, Baele G, Wissler L, Sanchez-Rodriguez A, Tirry L, Blais C, Demeestere K, Henz SR, Gregory TR, Mathieu J, Verdon L, Farinelli L, Schmutz J, Lindquist E, Feyereisen R, Van de Peer Y, 2011. The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. *Nature*, 479(7374): 487–492.

Han PJ, Zhao RH, Feng YT, Fan RJ, 2011. Control effect of diafenthiuron 50% SC against hawthorn red spider in apple orchard. *Shanxi Fruits*, 2011(4): 10–11. [韩鹏杰, 赵荣华, 封云涛, 范仁俊, 2011. 50%丁醚脲悬浮剂防治苹果园山楂红蜘蛛药效试验. 山西果树, 2011(4): 10–11.]

Hansen LG, Hodgson E, 1971. Biochemical characteristics of insect microsomes N- and O-demethylation. *Biochemical Pharmacology*, 20(7): 1569–1573.

He L, 2019. Effect of Heliothis virescens ascovirus 3 h on chitinase activity and expression in *Spodoptera exigua*. Master dissertation. Changsha: Hunan Agricultural University. [何磊, 2019. 烟芽夜蛾囊泡病毒 3 h 株对甜菜夜蛾几丁质酶活性和表达的影响. 硕士学位论文. 长沙: 湖南农业大学.]

Hu XB, Hu WJ, Tang W, 2015. Efficacy test of 50% butyl ether urea suspension agent for the control of cabbage diamondback moth. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 21(16): 76–77. [胡晓斌, 胡文俊, 唐文, 2015. 50%丁醚脲悬浮剂防治甘蓝小菜蛾药效试验. 安徽农学通报, 21(16): 76–77.]

Khajuria C, Buschman LL, Chen MS, Muthukrishnan S, Zhu KY, 2010. A gut-specific chitinase gene essential for regulation of chitin content of peritrophic matrix and growth of *Ostrinia nubilalis* larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40 (8): 621–629.

Li RJ, Wang KY, Xia XM, 2005. Breeding of *Tetranychus urticaria* resistant to meilingmycin and bromfenapyr and changes of its detoxification enzyme activity. *Journal of Plant Protection*, 32(3): 309–313. [李瑞娟, 王开运, 夏晓明, 2005. 二斑叶螨对梅岭霉素和溴虫腈的抗性选育及其解毒酶活力变化. 植物保护学报, 32(3): 309–313.]

Liu QJ, Yu Y, Liu YJ, Ma H, Zhang AS, Zhang SC, Li LL, Men XY, 2011. Research progress on occurrence and control of *Tetranychus urticae*. *Shandong Agricultural Science*, 2011(9): 99–101. [刘庆

娟, 于毅, 刘永杰, 马惠, 张安盛, 张思聪, 李丽莉, 门兴元, 2011. 二斑叶螨的发生与防治研究进展. 山东农业科学, 2011 (9): 99–101.]

Luo YJ, Wu WW, Wang QG, Ding W, 2012. Monitoring of antimicrobial resistance of cinnabar leaf mites in fresh cut flower producing areas of Kunming area. *Chinese Bulletin of Entomology*, 49(2): 359–363. [罗雁婕, 吴文伟, 王其刚,丁伟, 2012. 昆明地区鲜切花产区朱砂叶螨抗药性监测. 应用昆虫学报, 49(2): 359–363.]

Lv JJ, 2013. Molecular mechanism of resistance of *Tetranychus urticae* to spironylate. Master dissertation. Lanzhou: Gansu Agricultural University. [吕娟娟, 2013. 二斑叶螨对螺螨酯的抗性分子机理研究. 硕士学位论文. 兰州: 甘肃农业大学.]

Meng HS, Wang KY, Jiang XY, Yi MQ, 2000. Determination of resistance of citrus *Panonychus citri* to commonly used several acaricides. *Agrochemicals*, 39(2): 26–28. [孟和生, 王开运, 姜兴印, 仪美芹, 2000. 桔全爪螨对常用杀螨剂的抗药性测定. 农药, 39(2): 26–28.]

Shen YF, Shen HM, Yue XL, Guo JM, Song LW, 2014. Breeding of avermectin resistant strain of *Tetranychus urticaria* and its detoxification enzyme activity change. *Plant Protection*, 40(5): 44–48, 74. [沈一凡, 沈慧敏, 岳秀利, 郭金梅, 宋丽雯, 2014. 二斑叶螨抗阿维菌素品系选育及其解毒酶系活力变化. 植物保护, 40(5): 44–48, 74.]

Song LW, Shen YF, Yue XL, Guo JM, Shen HM, 2014. Changes in the activity of detoxification enzymes in anti-pyridoxine and sensitive strains of *Tetranychus truncatus*. *Acta Entomologica Sinica*, 57(3): 323–329. [宋丽雯, 沈一凡, 岳秀利, 郭金梅, 沈慧敏, 2014. 截形叶螨抗哒螨灵品系和敏感品系体内解毒酶活性的变化. 昆虫学报, 57(3): 323–329.]

Stumpf N, Nauen R, 2002. Biochemical markers linked to abamectin resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 72(2): 111–121.

Tian RH, Zhou YS, Li ZZ, Piao JZ, Gao P, 2012. Realized heritability and laboratory resistance selection of *Tetranychus urticae* to spirodiclofen. *Journal of Plant Protection*, 39(3): 287–288. [田如海, 周玉书, 李忠洲, 朴静子, 高萍, 2012. 二斑叶螨对螺螨酯的抗性选育及现实遗传力. 植物保护学报, 39(3): 287–288.]

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 Biochemistry and Molecular Biology*, 40(8): 563–572.

Van Asperen K, 1962. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorinmetric method. *Journal of Insect Physiology*, 8(4): 401–414.

Wang D, Zhang BC, Ding W, Zhang YQ, Luo JX, 2016. Effect of curcumin on chitinase gene expression of *Tetranychus cinnabarinus*. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 18(2): 165–176. [王丹, 章冰川, 丁伟, 张永强, 罗金香, 2016. 姜黄素对朱砂叶螨几丁质酶基因表达的影响. 农药学学报, 18(2): 165–176.]

Wang XQ, Yang SY, Lan QX, Gao XJ, Shen HM, 2009. Resistance of *Tetranychus urticaria* to cypermethrin ester and cross resistance to 17 common acaricides. *Journal of Gansu Agricultural University*, 44(2): 97–100. [王兴全, 杨顺义, 兰清秀, 高新菊, 沈慧敏, 2009. 二斑叶螨对甲氰菊酯抗药性选育及其对 17 种常用杀螨剂的交互抗性. 甘肃农业大学学报, 44(2): 97–100.]

Wang ZX, Zhou W, He C, Huang BH, Hu F, 2023. Toxicity of lufenuron and its effects on the chitin content and chitinase activity of *Spodoptera frugiperda* larvae. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 60(4): 1271–1279. [王增霞, 周婉, 何灿, 黄保宏, 胡飞, 2023. 虱螨脲对草地贪夜蛾幼虫的毒力及对其几丁质含量和几丁质酶活性的影响. 应用昆虫学报, 60(4): 1271–1279.]

Xia WK, Shen XM, Ding TB, Niu JZ, Zhong R, Liao CY, Feng YC, Dou W, Wang JJ, 2016. Functional analysis of a chitinase gene during the larval-nymph transition in *Panonychus citri*, by RNA interference. *Experimental and Applied Acarology*, 70(1): 1–15.

Xu JL, Li JJ, Wang NM, Xue CB, 2021. Detection of resistance of diamondback moth populations to eight commonly used insecticides in some areas of China. *Plant Protection*, 47(2): 239–242. [徐巨龙, 李静静, 王念猛, 薛超彬, 2021. 我国部分地区田间小菜蛾种群对 8 种常用杀虫剂的抗性检测. 植物保护, 47(2): 239–242.]

Yang SY, 2014. Study on the resistance mechanism of *Tetranychus urticaria* to abamectin and spirulin ethylester. Doctor dissertation. Lanzhou: Gansu Agricultural University. [杨顺义, 2014. 二斑叶螨对阿维菌素和螺虫乙酯的抗性机理研究. 博士学位论文. 兰州: 甘肃农业大学.]

Yang ZG, Xie DY, Ni J, Chai JP, Jiang XJ, Luo YJ, 2022. Cross-resistance of acaricides and relative fitness of diafenthiuron-resistant strain of *Tetranychus urticae*. *Agrochemicals*, 61(2): 143–148.[杨振国, 谢道燕, 倪婧, 柴建萍, 江秀均, 罗雁婕，2022. 二斑叶螨抗丁醚脲品系对杀螨剂的交互抗性和相对适合度. 农药, 61(2):143–148.]

Ye TQ, Yang SY, Li WP, 2020. Effect of sublethal doses of azocyclotin on detoxification enzymes of *Tetranychus urticus*. *Grassland and Turf*, 42(2):119–123.[叶调琴, 杨顺义, 李文平, 2020. 亚致死剂量三唑锡对二斑叶螨 *Tetranychus urticus* 解毒酶系的影响. 草原与草坪，42(2): 119–123.]

Zhang ZG, Shen HM, Duan XL, Yang SY, Gao XJ, 2011. Resistance of *Tetranychus urticaria* to spiroform ester and cross resistance to 18 acaricides. *Plant Protection*, 37(1): 82–85. [张志刚, 沈慧敏, 段辛乐, 杨顺义, 高新菊, 2011. 二斑叶螨对螺螨酯抗药性及对 18 种杀螨剂交互抗性. 植物保护, 37(1): 82–85.]

Zhang ZT, Peng Y, Liu FX, 2007. Sensitivity of the grass spider population in different habitats to pyrethroid insecticides and determination of detoxification enzyme activity *in vivo*. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 9(1): 84–87. [张征田, 彭宇, 刘凤想, 2007. 不同生境的草间钻头蛛种群对拟除虫菊酯类杀虫剂的敏感性及体内解毒酶活性的测定. 农药学学报, 9(1): 84–87.]