

柑橘全爪螨田间种群敏感性测定及三种主要解毒酶活性比较^{*}

丁天波 牛金志 夏文凯 孙倩倩 豆 威 王进军^{**}

(西南大学植物保护学院 重庆 400716)

摘 要 为明确重庆地区柑橘全爪螨 *Panonychus citri* (McGregor) 对常用杀螨剂的抗性水平, 本研究采用阿维菌素、哒螨灵、三唑锡、螺螨酯 4 种不同类型杀螨剂对柑橘全爪螨重庆北碚种群、璧山种群、武隆种群和忠县种群进行了田间敏感性测定。结果表明, 柑橘全爪螨 4 个种群对三唑锡表现最不敏感, 致死中浓度 LC_{50} 在 209.9 ~ 370.9 mg/L 之间。璧山种群对阿维菌素敏感性最高, 武隆种群和忠县种群对阿维菌素的相对抗性分别达 12 倍和 11 倍。哒螨灵监测结果表明, 北碚种群的抗性水平显著高于其他 3 个种群。而北碚种群对螺螨酯的 LC_{50} 仅为 1.2 mg/L, 显著低于其他种群。柑橘全爪螨 4 个种群解毒酶活性研究发现, 解毒酶活性的高低与不同种群抗性水平之间并没有明显相关性, 这可能同各地区施药背景不同、综合防治措施不同、各杀螨剂作用机理不同、不同种群体内代谢抗性及其靶标抗性水平差异有关。

关键词 柑橘全爪螨, 抗性监测, 细胞色素 P450 单加氧酶, 谷胱甘肽 S-转移酶, 羧酸酯酶

Susceptibility to acaricides and detoxification enzyme activity of four field populations of *Panonychus citri*

DING Tian-Bo NIU Jin-Zhi XIA Wen-Kai SUN Qian-Qian DOU Wei WANG Jin-Jun^{**}

(College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract The susceptibility of four Chongqing populations of the citrus red mite *Panonychus citri* (McGregor) to four commonly used acaricides, abamectin, azocyclotin, pyridaben and spiroticlofen, was investigated. The results show that all four populations were least sensitive to azocyclotin, with LC_{50} values ranging from 209.9 to 370.9 mg/L, relative to the other three acaricides. The Bishan population exhibited the highest level of sensitivity to abamectin; LC_{50} values of the Wulong and Zhongxian populations were 12- and 11-times higher than that of Bishan population. Although the Beibei population had significantly higher resistance to pyridaben, it had a low LC_{50} value to spiroticlofen. Investigation of the activities of the main detoxification enzymes (cytochrome P450 monooxygenases, glutathione S-transferase, carboxylesterase) indicated that there was no significant correlation between resistance levels and detoxification enzyme activity. These could possibly be caused by different strategies of applying acaricides in the field, differences in mode of action between different acaricides and different resistance mechanisms in the four populations.

Key words *Panonychus citri*, resistance monitoring, cytochrome P450 monooxygenases, glutathione S-transferase, carboxylesterase

柑橘全爪螨 *Panonychus citri* (McGregor), 又名柑橘红蜘蛛、瘤皮红蜘蛛, 隶属蛛形纲 (Arachnida), 蜱螨亚纲 (Acari), 叶螨科 (Tetranychidae), 全爪螨属 (*Panonychus*)。柑橘全

爪螨作为橘园三大害螨之一, 是一种世界性的多食性害螨。目前, 在我国重庆、四川、福建、湖南、江西、浙江、广西等大部分柑橘产区, 柑橘全爪螨都有分布且发生严重 (葛兴仁, 1989; 徐南昌等,

^{*} 资助项目: 公益性行业 (农业) 科研专项 (20110320)。

^{**} 通讯作者, E-mail: jjwang7008@yahoo.com

收稿日期: 2012-02-06, 接受日期 2012-02-26

2003)。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。该螨一年发生多代,其代数随地区温度高低而变化,每年有2个明显的发生高峰期。其主要以成螨、若螨和幼螨刺吸叶片、绿色嫩梢及果实表皮,被害叶片呈现许多灰白色小斑点,失去光泽,导致大量落叶和枯梢;被害果实呈现灰白色,严重时造成落果,经济损失很大。

在综合防控害螨的过程中,化学防治因其防效好、收效快、使用方便等特点仍然作为一项重要的措施。由于杀螨剂的长期、大量、不合理使用等人为因素以及柑橘全爪螨体小、繁殖力强、发育历期短,世代多等自身特点,使得柑橘全爪螨对各类杀螨剂的抗性迅速发展,导致相关杀螨剂的使用效果受到严重影响。为确保抗性治理的有效进行,柑橘全爪螨田间种群的抗性监测是尤为关键的首要环节。到目前为止,在我国重庆、四川、湖北、福建、浙江等地都已相继开展了柑橘全爪螨田间抗性监测。历年来抗性监测结果表明,柑橘全爪螨已对有机磷类、有机氯类、有机硫类、有机锡类、有机氮类、拟除虫菊酯类、氨基甲酸酯类、杂环类、新型季酮酸类及新型生物源类杀虫剂均已产生不同程度的抗药性(陈达荣和钟捷英,1990;冉春等,2008;Ran *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2010; Niu *et al.*, 2011)。

昆虫(螨)主要的抗性机制分为代谢抗性和靶标抗性,其中代谢抗性是昆虫(螨)对杀虫(螨)剂抗性形成和发展的重要机制。昆虫(螨)体内包含三大解毒酶系:酯酶系(esterase, ESTs),细胞色素P450酶系(cytochrome P450 monooxygenases, P450s),谷胱甘肽S-转移酶(glutathione S-transferase, GSTs)。前人研究表明,螨体内初级代谢能力的增强是其对阿维菌素、哒螨酮、双甲脒、甲基对硫磷、灭多虫、三氯杀螨醇、螺螨酯、甲氰菊酯、啶螨酯、水胺硫磷等多种类型杀螨剂产生抗性的主要原因之一(Fergusson-Kolmes *et al.*, 1991; 孟和生和王开运,2000; Tsagkarakou *et al.*, 2002; 赵卫东等,2003; 何林等,2004; He *et al.*, 2009; 高新菊和沈慧敏,2011)。

本研究选用4种不同类型的常用杀螨剂,对2011年重庆4个柑橘产区柑橘全爪螨进行田间敏感性监测,并对柑橘全爪螨4个地理种群体内CarE、GSTs、P450s的酶活性进行测定。旨在明确

重庆地区柑橘全爪螨抗性水平,探索代谢酶系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2011年4—6月间采集。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内;璧山种群(BS):采自重庆市璧山县七塘镇柑橘园内;武隆种群(WL):采自重庆市武隆县凤山柑橘园内;忠县种群(ZX):采自重庆市忠县涂井乡果园。

1.2 供试药剂

3.2%阿维菌素乳油(有效成分:阿维菌素,山东京博农化有限公司);15%哒螨灵乳油(有效成分:哒螨灵,南京红太阳股份有限公司);20%三唑锡悬浮剂(有效成分:三唑锡,成都皇牌作物科学有限公司);24%螺螨酯悬浮剂(有效成分:螺螨酯,拜耳作物科学公司)。

考马斯亮蓝G-250(Fluka);牛血清蛋白(BSA, sigma);1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB,上海试剂一厂);还原性谷胱甘肽(GSH,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司); 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);3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMBZ, Sigma);细胞色素C(Sigma)。

1.3 生物测定

生物测定采用叶碟浸渍法(Yamamoto *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 2010),并稍加改进。新鲜柠檬叶片采自中国农业科学院柑橘桔研究所柠檬园内,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4 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。成螨生测: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。幼螨生测:用毛笔挑取20~30头雌成螨至每片叶碟中产卵,12 h后,将雌成螨移走,待幼螨孵化后,处理方法同成螨生测。药剂处理后,放入光照培养箱中,温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,相对湿度为

75% ± 5%, 光周期为 L:D = 14:10。24 h 后, 检查死亡率, 用毛笔末端轻触螨体, 若螨能够行动或足仍能活动则界定为存活, 否则为死亡。其中阿维菌素、三唑锡、哒螨灵生物测定采用的供试螨体为雌成螨, 而螺螨酯生物测定时采用幼螨为供试螨体。

1.4 解毒酶活性分析

1.4.1 羧酸酯酶 (CarE) 活性测定 参照 Van Asperen (1962) 方法。挑取柑橘全爪螨雌成螨 200 头, 加入磷酸缓冲液 (PBS, 0.04 mol/L, 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。将 75 μL 酶液同 100 μL α-醋酸萘酯 (3×10^{-4} mol/L, 其中含 1×10^{-4} mol/L 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。所测酶液与对照 OD 值之差, 根据 α-萘酚标准曲线, 得出相应产物量, 再除以酶液中的实际蛋白含量, 即得羧酸酯酶比活力 (nmol/10 min/μg)。

1.4.2 谷胱甘肽 S-转移酶 (GSTs) 活性测定 参照 Habig 等 (1974) 方法。挑取柑橘全爪螨雌成螨 200 头, 加入 Tris-HCl 缓冲液 (0.05 mol/L, pH 7.5) 2 mL 于冰水浴中匀浆。匀浆液于 4℃, 5 000 g 条件下离心 5 min, 取上清液, 继续在 4℃, 17 500 g 条件下离心 15 min, 收集上清液, 过滤后即为待测酶液。将 200 μL 底物 (0.6 mmol/L CDNA 同 6 mmol/L GSH 以 1:1 体积比均匀混合) 在酶标仪中 37℃ 下保温反应 20 min, 然后将 100 μL 酶液同底物均匀混合, 37℃ 下, 记录在 340 nm 处 5 min 内 OD 变化值。根据公式 GSTs 活力单位 ($\mu\text{mol}/\text{min}$) = $(\Delta\text{OD}_{340} \cdot v) / (\varepsilon \cdot L)$ 。其中 ΔOD_{340} 为吸光度每分钟的变化值 ($\Delta\text{OD}_{340}/\text{min}$)、 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)。根据酶源蛋白含量测定结果, 最终计算出 GSTs 比活力 (nmol/min/μg)。

1.4.3 细胞色素 P450 单加氧酶 (P450s) 活性测定 参照 Brogdon 等 (1997), Penilla 等 (2007) 和 Tiwari 等 (2011) 方法。挑取柑橘全爪螨雌成螨 200 头, 加入磷酸缓冲液 (PBS, 0.1 mol/L, pH 7.5) 2 mL 于冰水浴中匀浆。匀浆液于 4℃, 12 600 r/m

条件下离心 15 min, 收集上清液, 过滤后即为待测酶液。反应体系为 20 μL 酶液, 80 μL 磷酸钾缓冲液 (0.625 mol/L, pH 7.2), 200 μL TMBZ (0.01 g TMBZ 溶于 5 mL 甲醇和 15 mL 0.25 mol/L, pH 5.0 的醋酸钠缓冲液), 25 μL H_2O_2 溶液 (体积比为 3%)。将反应体系置于室温 (25 ~ 27℃) 下反应 2 h 后, 在 25℃ 下, 450 nm 处进行读数, 计算所测酶液同对照 OD 值之差。根据细胞色素 C 标准曲线, 得到产物量, 除以酶液中实际蛋白含量, 即为细胞色素 P450 比活力 (equivalent units of cytochrome P450/mg of protein, EU of P450/(mg pro))。

1.4.4 酶源蛋白含量测定 参照 Bradford (1976) 方法。将 50 μL 酶液, 200 μL 考马斯亮蓝 G-250 混合均匀, 对照用磷酸缓冲液 (0.1 mol/L, pH 7.0) 替代酶液, 25℃ 保温反应 10 min 后, 595 nm 处测 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)。

1.5 数据分析

各杀螨剂生测数据采用 SPSS 16.0 进行处理, 求出毒力回归直线方程和致死中浓度 LC_{50} 值。将各地理种群 LC_{50} 进行比较, 得到其相对抗性倍数 RR。用 SPSS 16.0 进行单因素方差分析, 差异显著后以邓肯氏新复极差法进行酶活性和蛋白含量多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 抗性监测

2011 年重庆地区柑橘全爪螨对 4 种不同类型常用杀螨剂的抗性监测结果见表 1。从表 1 可以看出, 柑橘全爪螨 4 个地理种群对三唑锡表现最不敏感, 致死中浓度 LC_{50} 在 209.9 ~ 370.9 mg/L 之间, 对另外 3 种农药的抗性水平维持在一个相对较低的水平。

柑橘全爪螨不同地理种群对阿维菌素生测结果表明, 璧山种群对阿维菌素最为敏感, LC_{50} 仅为 0.6 mg/L, 并将其作为相对敏感种群。北碚种群对此杀螨剂的 LC_{50} 为 1.1 mg/L, 同璧山种群相比, 敏感性有所下降, 但无显著差异。但武隆种群和忠县种群对阿维菌素的相对抗性分别达到了 12 倍和 11 倍, LC_{50} 均显著高于相对敏感种群。

柑橘全爪螨不同地理种群对三唑锡生测结果

表明,重庆北碚、璧山、武隆、忠县 4 个地区,柑橘全爪螨种群对三唑锡抗性水平均较高,其中忠县种群相对敏感。但北碚、璧山、武隆种群和相对敏感种群相比,对三唑锡的 LC_{50} 并无显著性差异。

柑橘全爪螨不同地理种群对哒螨灵生测结果表明,璧山种群表现最为敏感,因此作为相对敏感种群。4 个地理种群致死中浓度 LC_{50} (6.9 ~ 25.5 mg/L) 由低到高依次为:璧山种群、武隆种群、忠县种群、北碚种群。其中璧山、武隆、忠县 3 个地区

之间,柑橘全爪螨对哒螨灵抗性水平十分接近,北碚种群与相对敏感种群比较,相对抗性倍数达到了 4 倍。

柑橘全爪螨不同地理种群对螺螨酯幼螨生测结果表明,北碚种群 LC_{50} 仅为 1.2 mg/L,作为相对敏感种群。同其相比,武隆种群的相对抗性倍数为 3 倍,差异并不显著。忠县种群和璧山种群的相对抗性倍数依次为 5 倍和 8 倍,对螺螨酯 LC_{50} 显著高于相对敏感种群和武隆种群。

表 1 柑橘全爪螨 4 个地理种群对 4 种杀螨剂的抗性监测结果(2011)

Table 1 Concentration probit mortality data for abamectin, azocyclotin, pyridaben and spiroticlofen on four field-collected populations of *Panonychus citri* in 2011

杀螨剂 Acaricide	种群 Population	总数 <i>n</i>	发育阶段 Stage	卡方值 χ^2	斜率 (± SE) Slope (± SE)	LC_{50} [95% 置信限] LC_{50} [95% CI] (mg/L)	RR [95% 置信限] RR [95% CI]
阿维菌素 Abamectin	璧山 BS	643	成螨 Adult	6.13	1.36 (± 0.14)	0.6 [0.5; 0.9]	—
	北碚 BB	662	成螨 Adult	6.28	0.56 (± 0.09)	1.1 [0.7; 2.0]	2 [1; 2]
	忠县 ZX	678	成螨 Adult	7.33	0.68 (± 0.10)	7.3 [3.9; 21.1]	11 [8; 24]
	武隆 WL	621	成螨 Adult	3.99	0.43 (± 0.10)	7.3 [3.0; 57.3]	12 [6; 66]
三唑锡 Azocyclotin	忠县 ZX	596	成螨 Adult	5.59	0.97 (± 0.10)	209.9 [137.4; 291.6]	—
	武隆 WL	585	成螨 Adult	7.42	1.44 (± 0.13)	228.1 [173.8; 287.0]	1 [1; 1]
	北碚 BB	572	成螨 Adult	3.62	1.10 (± 0.12)	233.1 [140.3; 336.7]	1 [1; 1]
	璧山 BS	601	成螨 Adult	1.49	1.36 (± 0.14)	370.9 [270.3; 479.5]	2 [2; 2]
哒螨酮 Pyridaben	璧山 BS	690	成螨 Adult	6.02	1.80 (± 0.19)	6.9 [6.0; 7.9]	—
	武隆 WL	646	成螨 Adult	1.34	1.64 (± 0.31)	7.5 [6.3; 9.9]	1 [1; 1]
	忠县 ZX	609	成螨 Adult	0.82	1.41 (± 0.22)	9.9 [8.0; 12.9]	1 [1; 2]
	北碚 BB	712	成螨 Adult	2.45	1.47 (± 0.20)	25.5 [19.4; 39.3]	4 [3; 5]
螺螨酯 Spiroticlofen	北碚 BB	594	幼螨 Larvae	1.74	1.44 (± 0.26)	1.2 [0.4; 2.1]	—
	武隆 WL	477	幼螨 Larvae	0.45	0.79 (± 0.18)	3.5 [1.2; 6.7]	3 [3; 3]
	忠县 ZX	626	幼螨 Larvae	1.70	0.70 (± 0.17)	6.6 [3.0; 12.6]	5 [6; 7]
	璧山 BS	551	幼螨 Larvae	1.86	0.69 (± 0.11)	10.2 [6.8; 16.0]	8 [8; 15]

注: χ^2 适合性检验理论值与实测值差异显著符合 ($P > 0.05$)。

Chi-squared goodness-of-fit test indicates no significant difference between theoretical and observed values ($P > 0.05$).

2.2 柑橘全爪螨不同地理种群羧酸酯酶 (CarE) 活性测定结果

CarE 活性测定结果见表 2。4 个地理种群之间 CarE 总活力和比活力均有显著差异 ($P < 0.05$)。CarE 总活力从大到小排列依次为:忠县种

群、北碚种群、武隆种群、璧山种群,但忠县种群 CarE 比活力在 4 个地理种群中最低,仅为 1.75 nmol/10 min/ μ g。北碚种群、武隆种群和璧山种群 CarE 的比活力同忠县种群的相对比值分别为 3.25、4.51、5.71 倍。

表 2 柑橘全爪螨 4 个地理种群 CarE 活性比较
Table 2 Comparison of the activities of CarE from four populations of *Panonychus citri*

种群 Population	蛋白含量 Protein ($\mu\text{g/mL}$)	CarE 活性 CarE activity	
		总活力 Total activity (nmol/min)	比活力 Specific activity (nmol/min/ μg)
北碚 BB	20.90 $\pm$ 1.25d	8.89 $\pm$ 0.73b	5.68 $\pm$ 0.36b
璧山 BS	4.95 $\pm$ 0.70a	4.70 $\pm$ 0.01a	9.99 $\pm$ 0.22d
武隆 WL	14.27 $\pm$ 1.04c	8.46 $\pm$ 0.14b	7.90 $\pm$ 0.13c
忠县 ZX	8.08 $\pm$ 0.61b	10.57 $\pm$ 0.23c	1.75 $\pm$ 0.39a

注:同列数据后标注不同字母表示存在显著性差异(邓肯氏新复极差法, $P < 0.05$)。下表同。
Data followed by different letters within the same column indicate significantly different at 0.05 level by Duncan's multiple range test). The same below.

2.3 柑橘全爪螨不同地理种群谷胱甘肽 S-转移酶(GSTs)活性测定结果

GSTs 活性测定结果见表 3。对 4 个地理种群 GSTs 总活力进行比较,发现北碚种群 GSTs 总活力最高,为 264.58 nmol/min;武隆种群 GSTs 总活力最低,为 41.67 nmol/min;而璧山种群和忠县种群 GSTs 总活力值最为接近。北碚种群 GSTs 总活力显著高于其他种群($P < 0.05$)。

武隆种群 GSTs 比活力最小,北碚种群、璧山

种群、忠县种群 GSTs 比活力分别为 603.09 nmol/min/ μg 、727.43 nmol/min/ μg 、1199.10 nmol/min/ μg 。ANOVA 分析结果表明,北碚种群、璧山种群、武隆种群的 GSTs 比活力之间均无显著差异,忠县种群 GSTs 比活力则显著高于武隆种群和璧山种群($P < 0.05$)。同武隆种群相比,北碚种群、璧山种群和忠县种群 GSTs 比活力的相对比值依次为 2.84、3.42 和 5.64。

表 3 柑橘全爪螨 4 个地理种群 GSTs 活性比较
Table 3 Comparison of the activities of GSTs from four populations of *Panonychus citri*

种群 Population	蛋白含量 Protein ($\mu\text{g/mL}$)	GSTs 活性 GSTs activity	
		总活力 Total activity (nmol/min)	比活力 Specific activity (nmol/min/ μg)
北碚 BB	23.40 $\pm$ 5.13b	264.58 $\pm$ 70.25b	603.09 $\pm$ 162.73ab
璧山 BS	10.48 $\pm$ 4.42a	111.80 $\pm$ 4.86a	727.43 $\pm$ 251.62ab
武隆 WL	9.81 $\pm$ 0.26a	41.67 $\pm$ 8.86a	212.45 $\pm$ 45.18a
忠县 ZX	4.69 $\pm$ 0.12a	112.56 $\pm$ 39.03a	1 199.10 $\pm$ 416.02b

2.4 柑橘全爪螨不同地理种群细胞色素 P450 单加氧酶(P450s)活性测定

P450s 活性测定结果见表 4。北碚种群 P450s 总活力最大(14.98 P450 等效单位),同武隆种群(11.90 P450 等效单位)相比,差异不显著,但显著

高于璧山种群(6.04 P450 等效单位)和忠县种群(7.72 P450 等效单位)。4 个地理种群 P450s 比活力均无显著差异,忠县种群 P450s 比活力最小,与其相比,璧山种群、武隆种群和北碚种群 P450s 比活力的相对比值分别为 1.05、1.31、1.46。

表 4 柑橘全爪螨 4 个地理种群 P450s 活性比较

Table 4 Comparison of the activities of crude P450s from four populations of *Panonychus citri*

种群 Population	蛋白含量 Protein ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	P450s 活性 P450s activity	
		总活力 (P450 等效单位) Total activity (EU of P450)	比活力 (P450 等效单位/ μg) Specific activity (EU of P450/ μg)
北碚 BB	$31.87 \pm 5.67\text{b}$	$14.98 \pm 3.88\text{b}$	$26.91 \pm 11.50\text{a}$
璧山 BS	$16.43 \pm 3.51\text{a}$	$6.04 \pm 1.02\text{a}$	$19.42 \pm 3.16\text{a}$
武隆 WL	$24.61 \pm 0.50\text{ab}$	$11.90 \pm 0.22\text{ab}$	$24.18 \pm 0.33\text{a}$
忠县 ZX	$19.30 \pm 0.58\text{a}$	$7.72 \pm 0.58\text{a}$	$18.43 \pm 2.01\text{a}$

3 讨论

本研究选择了重庆 4 个地区柑橘全爪螨田间种群,分别对阿维菌素、三唑锡、哒螨灵和螺螨酯 4 种不同类型的杀螨剂进行了敏感性监测。柑橘全爪螨不同地理种群对阿维菌素的 LC_{50} 存在较大差异,同璧山种群相比,武隆种群的相对抗性倍数达到了 12 倍,这可能与两地区间施药背景不同存在一定的关系。2009 年田间敏感性监测结果显示,北碚种群对阿维菌素的 LC_{50} 仅为 $0.02 \text{ mg}/\text{L}$,短短 2 年时间内该地区柑橘全爪螨对阿维菌素的抗性迅速上升(刘永华等,2010)。在 4 种杀螨剂中,柑橘全爪螨对三唑锡表现最不敏感,这与 2010 年重庆四川地区柑橘全爪螨田间抗性监测结果相似(Niu *et al.*, 2011)。与璧山种群、武隆种群和忠县种群相比,北碚种群对哒螨灵的敏感性最低,对比分析往年抗性监测结果,发现其敏感性呈下降趋势,前人研究表明哒螨灵在田间产生抗性的速度较快(孟和生和王开运,2000;刘永华等,2010;Niu *et al.*, 2011)。螺螨酯是一种季酮酸类杀螨剂,自 2005 年引入中国以来,因其良好的杀卵、幼螨及若螨活性,迅速成为橘园常用杀螨剂之一,但其对成螨效果甚微,故本研究采用幼螨对螺螨酯进行田间敏感性监测。生测结果表明,4 个地理种群对螺螨酯的 LC_{50} 在 $1.2 \sim 10.2 \text{ mg}/\text{L}$ 之间,同重庆往年监测结果(2006, $\text{LC}_{50} = 10.49 \text{ mg}/\text{L}$;2009, $\text{LC}_{50} = 3.29 \text{ mg}/\text{L}$)进行比较,说明重庆地区柑橘全爪螨对螺螨酯抗性发展的速度较为缓慢(Hu *et al.*, 2010)。研究发现,重庆地区柑橘全爪螨对常用的阿维菌素和哒螨灵敏感性下降的速度很快,此外 4 个地理种群均对其他药剂产生了不同程度的交互抗性,因此避免单一农药的连续使用,注意不同类型杀螨剂之间的轮换是延缓抗性发展的必要举

措。

昆虫(螨)体内解毒酶系对杀虫(螨)剂的初级代谢作用是昆虫(螨)抗性形成及发展的主要原因之一。近年来,对于不同类型杀螨剂抗性机制的研究在国内外也相继展开。赵卫东等(2003)通过比较二斑叶螨抗阿维菌素品系及敏感品系的解毒酶活力,发现抗性品系中多功能氧化酶(MFO)和 GSTs 的活性均有所提高。在进行朱砂叶螨对阿维菌素抗性机制的研究中也发现,3 种代谢酶活力的增强在其抗性形成的过程中起到重要的作用,并且 MFO 的作用尤为突出(He *et al.*, 2009)。

哒螨灵作为一类线粒体电子传递链抑制剂(METIs),在国内外被广泛使用,因近年来其抗性问题的不断突出,研究其抗性机制及寻找替代农药显得尤为重要。近年来监测结果表明,不同地区和作物上二斑叶螨均对哒螨灵产生了不同程度的抗性,并发现同其他类型杀螨剂之间存在交互抗性(Van Leeuwen *et al.*, 2009)。已有研究证明,二斑叶螨对哒螨灵的抗性可能与 MFO 和 CarE 的活性增强有关,并且有研究者指出哒螨灵的作用靶标可能是存在于呼吸链上的 NADH-CoQ 氧化还原酶(赵卫东等,2003;Lümmen, 2007)。通过对柑橘全爪螨进行哒螨灵的抗性选育,并开展生化毒理学研究,发现柑橘全爪螨体内 MFO 及 CarE 活性的增强是其哒螨酮抗性形成和发展的重要原因(孟和生和王开运,2000)。在重庆、四川不同地理种群对哒螨酮田间敏感性监测的基础上,对 GSTs 生化毒理学特性进行研究,发现 LC_{50} 与 GSTs 比活力呈正相关($r = 0.93$),暗示了 GSTs 也参与了柑橘全爪螨对哒螨酮的解毒代谢过程(Niu *et al.*, 2011)。

有机锡类杀螨剂在全球范围内用来进行害螨的防治已有 40 多年的历史,虫螨腈、三氯杀螨醇、

双甲脒、三唑锡都是该类常用杀螨剂。澳大利亚和日本学者对二斑叶螨的抗性机理研究中发现,酯酶同工酶及氧化酶活性的变化在虫螨腈抗性形成的过程中起到一定的作用(Van Leeuwen *et al.*, 2009)。而二斑叶螨体内酶系降解能力的增强,导致对三氯杀螨醇的敏感性降低(Fergusson-Kolmes *et al.*, 1991)。截至目前,国内外对三唑锡抗性机制的研究较少,其作用靶标尚不明确,仍需进一步研究。

螺螨酯进入中国之前,国外学者就进行了二斑叶螨对螺螨酯的抗性风险评估及抗性筛选,对其抗性机理进行生化及分子水平上的研究,表明二斑叶螨对螺螨酯抗性水平的形成与发展同P450s、GSTs及酯酶(ESTs)解毒代谢能力的增强有关(Van Pottelberge *et al.*, 2009)。通过本研究当中柑橘全爪螨对螺螨酯的抗性监测,并结合前人交互抗性研究表明,螺螨酯抗性水平呈逐年上升趋势,故对于螺螨酯作用靶标的探索将是未来研究的方向之一。

为了探明柑橘全爪螨体内三大解毒酶系在其对于不同杀螨剂抗性发展当中起到的作用,本研究对柑橘全爪螨北碚种群、璧山种群、武隆种群和忠县种群3种代谢酶进行了生化毒理学特性分析,测定其酶活及比活力。同4种杀螨剂的抗性监测数据结合分析,并没有发现两者之间存在很好的相关性。不同地区之间用药背景不同,并且各地区释放捕食螨等生物防治情况也不同,橘园生态系统物种多样性的差异都能导致柑橘全爪螨体内酶系的变化。此外本研究用于抗性监测的杀螨剂分属于4种类型,其作用机理及靶标也不同,此外昆虫(螨)行为抗性、生理抗性及靶标抗性的存在,也可能成为4个地区柑橘全爪螨代谢酶活性同敏感性之间没有相关性的原因。

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. *Anal. Biochem.*, 72(1): 248—254.

Brogdon W, McAllister J, Vulule J, 1997. Heme peroxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 13(3):233.

Fergusson-Kolmes LA, Scott JG, Dennehy TJ, 1991. Dicofo resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): cross-resistance and pharmacokinetics. *J. Econ. Entomol.*, 84(1):41—48.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB, 1974. Glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.*, 249(22):7130.

He L, Xue CH, Wang JJ, Li M, Li WC, Zhao ZM, 2009. Resistance selection and biochemical mechanism of resistance to two Acaricides in *Tetranychus cinnabarinus* (Boiduval). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 93(1):47—52.

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.

Lümmen P, 2007. Mitochondrial electron transport complexes as biochemical target sites for insecticides and acaricides // Ishaaya I, Nauen R, Horowitz AR (eds.). *Insecticides Design Using Advanced Technologies*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. 197—215.

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.

Penilla RP, Rodríguez AD, Hemingway J, Trejo A, López AD, Rodríguez MH, 2007. Cytochrome P450-based resistance mechanism and pyrethroid resistance in the field *Anopheles albimanus* resistance management trial. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 89(2):111—117.

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.

Tiwari S, Pelz-Stelinski K, Mann RS, Stelinski LL, 2011. Glutathione transferase and cytochrome P450 (general oxidase) activity levels in *Candidatus liberibacter asiaticus*-infected and uninfected Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 104(2):297—305.

Tsagkarakou A, Pasteur N, Cuany A, Chevillon C, Navajas M, 2002. Mechanisms of resistance to organophosphates in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) from Greece. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(4):417—424.

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, Vontas J, Tsagkarakou A, Tirry L, 2009.

- Mechanisms of acaricide resistance in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. *Biorational Control of Arthropod Pests.*, DOI:10.1007/978-90-481-2316-2_14
- Van Pottelberge S, Van Leeuwen T, Khajehali J, Tirry L, 2009. Genetic and biochemical analysis of a laboratory - selected spirodiclofen - resistant strain of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Pest Manag. Sci.*, 65(4):358—366.
- Yamamoto A, Yoneda H, Hatano R, Asada M, 1995. Genetic analysis of hexythiazox resistance in the citrus red mite, *Panonychus citri* (McGregor). *J. Pestic. Sci.*, 20(4):513—519.
- 陈达荣, 钟捷英, 1990. 福州地区桔全爪螨对水胺硫磷抗性测定. *植物保护*, 16(3):12—13.
- 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.
- 葛兴仁, 1989. 柑橘主要病虫预报与防治. 长沙:湖南科学技术出版社. 139—146.
- 何林, 谭仕禄, 曹小芳, 赵志模, 邓新平, 王进军, 2004. 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.
- 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. *农药学报*, 2(3):30—34.
- 冉春, 陈洋, 袁明龙, 刘浩强, 姚廷山, 王进军, 2008. 桔全爪螨田间种群对杀螨剂的敏感性. *植物保护学报*, 35(6):537—540.
- 徐南昌, 郎国良, 刘立峰, 2003. 桔全爪螨发生规律及防治. *植保技术与推广*, 23(9):22—23.
- 赵卫东, 王开运, 姜兴印, 仪美芹, 2003. 二斑叶螨对阿维菌素, 哒螨灵和甲氰菊酯的抗性选育及其解毒酶活力变化. *昆虫学报*, 46(6):788—792.