

二斑叶螨对阿维菌素敏感性的快速检测方法筛选^{*}

马 惠^{1**} 刘庆娟³ 张安盛² 韩凤英⁴ 张毓妹⁵ 周仙红² 于 毅^{2***}

(1. 山东省农业科学院棉花研究中心 济南 250100; 2. 山东省农业科学院植物保护研究所
山东省植物病毒学重点实验室 济南 250100; 3. 山东农业大学植物保护学院 泰安 271018;
4. 山东省农业管理干部学院现代农业技术系 济南 250100; 5. 河北农业大学植物保护学院 保定 071000)

摘 要 为了寻找一种快速检测二斑叶螨 *Tetranychus urticae* Koch 对阿维菌素敏感性的试验方法, 本试验分别采用酶标板法、玻璃管法、离心管法、玻片浸渍法和培养皿封膜法, 测定了阿维菌素处理后 1、2、3 和 4 h 时二斑叶螨的死亡率。结果发现, 酶标板法和玻璃管法操作不方便; 离心管法无法准确判断死亡与否; 玻片浸渍法作用速度慢; 培养皿封膜法方便快捷。据此得出, 采用培养皿封膜法于处理后 3 h 观察结果, 可以省时省力的测定二斑叶螨对阿维菌素的敏感性。

关键词 二斑叶螨, 阿维菌素, 敏感性, 快速检测方法

A rapid test to determine the sensitivity of *Tetranychus urticae* to abamectin

MA Hui^{1**} LIU Qing-Juan³ ZHANG An-Sheng² HAN Feng-Ying⁴ ZHANG Yu-Mei⁵
ZHOU Xian-Hong² YU Yi^{2***}

(1. Cotton Research Centre, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China; 2. Institute of Plant Protection, Key Laboratory for Plant Virology of Shandong, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China; 3. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China; 4. Department of Modern Agricultural Technology, Shandong Agricultural Administrators College, Jinan 250100, China; 5. College of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China)

Abstract In order to find the best method for determining the sensitivity of *Tetranychus urticae* Koch to abamectin, the effectiveness of 5 assays; the microtiter plate method, the glass tube residual film method, the centrifugal tube residual film method, the slide-dip method and the cling-film covered petri dish method, was evaluated. The results show that the microtiter plate and glass tube residual film method were not convenient, and that the centrifugal tube residual film method barely determined whether *T. urticae* adult individuals were alive or dead. The slide-dip method was very slow but the cling-film covered petri dish method proved a convenient and efficient way to detect the sensitivity of *T. urticae* to abamectin 3 hours after treatment with this pesticide.

Key words *Tetranychus urticae*, abamectin, sensitivity, rapid determination method

二斑叶螨 *Tetranychus urticae* Koch 是一种重要的世界性害螨。该螨对化学农药易产生抗药性, 澳大利亚棉花上的二斑叶螨在毕芬宁登记注册 4 年后, 就产生了抗药性 (Herron *et al.*, 2001)。20 世纪 80 年代二斑叶螨传入我国。由于它传入我

国以前就对许多种农药已经产生了抗性, 国内防治上主要依赖化学农药, 这使得二斑叶螨的抗药性发展迅速, 为害日益严重 (高新菊等, 2010; 张志刚等, 2011; 赵卫东等, 2011)。阿维菌素因其独特的作用机制, 见光易分解、无生物积累和残留、

^{*} 资助项目: 公益性行业 (农业) 科研专项 (200903033)。

^{**} E-mail: mahui8.18@163.com

^{***} 通讯作者, E-mail: robertyuyi@163.com

收稿日期: 2012-01-06, 接受日期: 2012-04-01

不易污染环境等优点,成为人们防治二斑叶螨的首选药剂。但是,室内实验表明施用阿维菌素连续选育 20 代,二斑叶螨对阿维菌素产生较高抗性(任健等,2006)。我国各地区的用药情况存在较大差异,二斑叶螨对阿维菌素的抗性亦不同,为更好地指导农民合理用药,需要能快速地检测出二斑叶螨对阿维菌素的敏感性的方法。但目前对二斑叶螨的抗性监测多采用玻片浸渍法,处理 24 h 后才能得出结果,难以达到快速检测的目的。为了给二斑叶螨的抗性监测提供一种省时、省力、快速、简便的方法,本研究对阿维菌素敏感性的快速检测方法进行了比对研究。

1 材料与方法

1.1 供试二斑叶螨

二斑叶螨敏感品系,由中国农业科学院蔬菜研究所提供。

1.2 供试药剂

阿维菌素原药,97.75%,石家庄凯利达提供。

1.3 毒力测定方法

1.3.1 酶标板法 先将阿维菌素用丙酮配置成 1 000 mg/L 的母液,使用时用丙酮稀释,按等比或等差稀释成需要的浓度。从稀释好的药液中吸取适量,滴入酶标板的凹槽中,使药液分布均匀,晾干后将适量二斑叶螨雌成螨挑入酶标板的凹槽中,用盖玻片盖住。每个处理 3 个重复,放在温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,相对湿度为 75% 的人工气候箱中分别于 1、2、3 和 4 h 后检查死亡率。

1.3.2 玻璃管法 采用鲁艳辉等(2009)的玻璃管药膜法,并稍加改进。从稀释好的药液中吸取适量加入到直径 1 cm,高 3 cm 的玻璃管中,滚匀,待丙酮挥发后用于毒力测定。并用棉塞封口。对照单独用丙酮处理。挑取大小一致、体色鲜艳、行动活泼的雌成螨进行试验,每个制备好的药膜管放置 20 头二斑叶螨,每个处理 3 个重复,在温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,相对湿度为 75% 的人工气候箱中分别于 1、2、3 和 4 h 后检查死亡率。

1.3.3 离心管法 从稀释好的药液中吸取适量加入到离心管中,盖上盖子后,旋转药液分布均匀,开盖晾干后将二斑叶螨雌成螨挑入,每管放 20 头,并封紧盖子。每个处理 3 个重复,放入温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,相对湿度为 75% 的人工气候箱中,分

别于 1、2、3 和 4 h 后检查死亡率。计算出每个处理的平均死亡率。

1.3.4 玻片浸渍法 参照 FAO(1980)推荐的测定害螨抗药性的标准方法——玻片浸渍法。其方法是将双面胶带剪成 2~3 cm 长,贴在载玻片的一端,用镊子揭去粘胶上的纸片,用零号毛笔挑取大小一致、体色鲜艳、行动活泼的雌成螨,将其背部粘在双面胶带上(注意:不要粘住螨足、螨须和口器),每片粘 40 头,分成 3 行。每个处理 3 个重复,在温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,相对湿度为 75% 的人工气候箱中放置 1 h 后,用双目镜观察,剔除死亡和不活泼个体,保留 30 头。将药剂稀释 3 个浓度,把带螨载玻片一端浸入药液中,轻轻摇动,5 s 后取出,迅速用吸水纸吸干螨体及周围多余的药液,置于温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,相对湿度为 75% 的人工气候箱中,分别于 1、2、3 和 4 h 后检查死亡率,并计算出每个处理的平均死亡率。

1.3.5 培养皿封膜法 采用玻片浸渍法浸虫处理后,将玻片放入培养皿中,用封口膜封住,形成密闭的药膜空间。每个处理 3 个重复,放在温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,相对湿度为 75% 的人工气候箱中,分别于 1、2、3 和 4 h 后检查死亡率,并计算出每个处理的平均死亡率。

2 结果与分析

2.1 酶标板法

酶标板法测定的各浓度在处理 1、2、3 和 4 h 的各时间段的死亡率差异均不显著(表 1)。操作上,此方法挑虫非常困难,二斑叶螨太活泼,挑入后很快爬出。控制在凹槽里的二斑叶螨会爬到盖玻片上,难以控制虫体与药膜接触的时间。查结果时由于二斑叶螨虫体太小,而且容易吐丝结网,多头虫体聚集在一起,镜检困难,难以准确判断虫体死亡与否。

2.2 玻璃管法

玻璃管法测定的各浓度在处理 1、2、3 和 4 h 时死亡率差异均不显著,同一观察时间的各浓度之间的死亡率差别也很小(表 2)。操作上,试虫很容易挑入玻璃管中,但查结果时发现,二斑叶螨多数会逃离药膜,沾附在棉塞上,药膜起不到作用。查结果时也不易将虫体从棉塞上取下,操作极其不方便。

表 1 酶标板法快速测定二斑叶螨对阿维菌素的敏感性

Table 1 The sensitivity of *Tetranychus urticae* to abamectin determined by using microtiter plate method

浓度 Concentration (mg·L ⁻¹)	校正死亡率 Corrected mortality rate(%)			
	1 h	2 h	3 h	4 h
0.4	20.3 ± 3.1a	19.7 ± 3.8a	23.0 ± 2.6a	24.0 ± 2.0a
0.2	19.3 ± 0.58a	20.3 ± 1.5a	20.7 ± 1.5a	21.7 ± 1.5a
0.1	17.3 ± 1.5a	19.7 ± 2.5a	20.3 ± 2.1a	20.0 ± 2.6a

注:表中数据为平均值 ± 标准误。同行数据后标有不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。下表同。

The data in the table are presented as mean ± SE. Values in same row followed by different small letters are significantly different among the temperatures by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$). The same below.

表 2 玻璃管法快速测定二斑叶螨对阿维菌素的敏感性

Table 2 The sensitivity of *Tetranychus urticae* to abamectin determined by using glass tube residual film method

浓度 Concentration (mg·L ⁻¹)	校正死亡率 Corrected mortality rate(%)			
	1 h	2 h	3 h	4 h
0.4	23.3 ± 2.5a	23.7 ± 3.1a	26.0 ± 2.6a	26.7 ± 3.2a
0.2	20.0 ± 2.0a	20.3 ± 2.1a	24.3 ± 3.1a	23.0 ± 3.6a
0.1	17.7 ± 1.5a	18.0 ± 2.0a	20.3 ± 2.1a	23.0 ± 4.6a

2.3 离心管法

此方法对二斑叶螨的作用速度很快,药后 1 h 各浓度的死亡率均大于 75%,但药后 1、2、3 和 4 h

时的各时间段均无显著性差异(表 3)。查结果时,虫体多数结网抱团,需要一头头的分开再镜检,操作麻烦。

表 3 离心管法快速测定二斑叶螨对阿维菌素的敏感性

Table 3 The sensitivity of *Tetranychus urticae* to abamectin determined by using centrifugal tube residual film method

浓度 Concentration (mg·L ⁻¹)	校正死亡率 Corrected mortality rate(%)			
	1 h	2 h	3 h	4 h
0.4	83.3 ± 3.2a	83.3 ± 1.5a	88.7 ± 4.0a	90.0 ± 4.6a
0.2	78.0 ± 3.6a	80.0 ± 3.0a	85.7 ± 8.7a	86.7 ± 8.1a
0.1	76.7 ± 3.5a	80.0 ± 3.0a	83.0 ± 7.2a	83.3 ± 6.7a

2.4 玻片浸渍法

从表 4 中结果可以看出,药后二斑叶螨死亡速度非常慢,药后 1 h 各浓度死亡率均为 0,药后 4 h 的死亡率也都低于 50%。0.4 mg·L⁻¹ 处理的试虫随着时间的延长,死亡率提高较快,药后 1、2、3 和 4 h 4 个观察时间的死亡率之间均存在显著性差异,时间相差越长,死亡率差异越大。0.2 和 0.1 mg·L⁻¹ 处理的试虫在药后 3 h 和 4 h 时死亡率无显著性差异,但均与 1 h、2 h 时存在显著性差异。

2.5 培养皿封膜法

0.4 mg·L⁻¹ 处理的试虫随着时间的延长,死亡率提高较快,药后 1、2、3 和 4 h 4 个观察时间的死亡率之间均存在显著性差异,时间相差越长,死亡率差异越大。0.2 mg·L⁻¹ 处理的试虫在药后 3 和 4 h 时死亡率无显著性差异,但均与 1 h、2 h 时存在显著性差异。0.1 mg·L⁻¹ 处理的试虫在药后 2、3 和 4 h 时无显著性差异,但均与 1 h 的死亡率差异显著(表 5)。

表 4 玻片浸渍法快速测定二斑叶螨对阿维菌素的敏感性
Table 4 The sensitivity of *Tetranychus urticae* to abamectin determined by using slide-dip method

浓度 Concentration (mg·L ⁻¹)	校正死亡率 Corrected mortality rate(%)			
	1 h	2 h	3 h	4 h
0.4	0 ± 0.0a	20.2 ± 1.2b	40.4 ± 1.5c	45.8 ± 2.5d
0.2	0 ± 0.0a	17.4 ± 1.5b	25.5 ± 4.2c	27.8 ± 3.2c
0.1	0 ± 0.0a	7.9 ± 1.0b	18.6 ± 2.9c	20.3 ± 2.9c

表 5 培养皿封膜法快速测定二斑叶螨对阿维菌素的敏感性
Table 5 The sensitivity of *Tetranychus urticae* to abamectin determined by using petri dish of sealing film method

浓度 Concentration (mg·L ⁻¹)	校正死亡率 Corrected mortality rate(%)			
	1 h	2 h	3 h	4 h
0.4	20.2 ± 2.1a	47.8 ± 2.1b	67.7 ± 2.1c	96.7 ± 2.9d
0.2	13.5 ± 2.6a	25.0 ± 2.6b	47.1 ± 2.6c	50.0 ± 5.0c
0.1	10.7 ± 1.2a	19.4 ± 2.1b	19.4 ± 1.2b	20.0 ± 1.7b

3 讨论

阿维菌素作为抗生素类杀虫杀螨剂,作用机理是刺激虫体产生 γ -氨基丁酸,阻断运动神经信息的传递,使害虫在几个小时内迅速麻痹、拒食、缓动或不动。结合目前农药高效安全科学的施用要求,尽早了解不同地区二斑叶螨对阿维菌素的敏感性情况非常必要,但目前还没有关于二斑叶螨对药剂敏感性快速测定的报道。快速测定最好在几个小时之内就能得出结论。因此本试验设计了药后 1、2、3 和 4 h 分别观察试验结果的不同处理进行比较,以选择合适的观察时间。结合二斑叶螨虫体极小极活跃的特点,笔者进行了几种快速测定方法的比较试验。

酶标板上有多个凹槽,可以同时进行多个重复和处理的试验。但是试验证明,由于二斑叶螨虫体太活跃,很难将其固定在凹槽中,操作极不方便,同时,由于虫体很容易逃跑,使得和药膜的接触不充分,也就形成了各浓度在药后各观察时间的死亡率都很低的情况,因此弃用。玻璃管法是一种国内外常用的药剂敏感度测定方法(Shotkoski *et al.*, 1990; Shufran *et al.*, 1997; Zhu and Gao, 1998; Zhu *et al.*, 2000),特别适合用于害虫对药剂敏感性的快速测定。但由于二斑叶螨的结网特性以及虫体太小的原因,使得这一方法操

作非常困难。同样存在和药膜接触不充分的情况,使得死亡率均较低,而且没有梯度和规律。考虑到二斑叶螨容易粘到棉塞上,笔者便考虑到用离心管代替的方法。离心管盖上盖子后密封好,二斑叶螨便无法逃脱。同时将离心管的盖子内侧也形成药膜,使得离心管内壁整体上都是药膜空间,对二斑叶螨作用面广,击倒速度快,这也是离心管法测定的药后死亡率均较高的原因。但在逆境下,二斑叶螨很快抱团,镜检判断困难。试过减少试虫数量的办法,但即使是 5 头,也很快抱团,难以区分试虫死活,而且试虫数量过少的话也不能准确说明问题。尽管离心管法可以达到快速低剂量的要求,但是操作的复杂使得此方法不可取。

玻片浸渍法操作方便,结果准确,但是作用速度太慢,低剂量药剂难以达到快速检测的要求。结合离心管方法的快速性,对玻片浸渍法进行了改进,药后将玻片放入培养皿中,用封口膜封上,形成了一个相对封闭的空间。阿维菌素对螨类具有触杀和胃毒作用,同时具有微弱的熏蒸作用,培养皿封膜法比玻片浸渍法形成的空间内药剂浓度要高,使得药剂的触杀、胃毒和熏蒸 3 种方式同时进行,低剂量就可以起到快速杀螨的作用。既达到了操作方便的要求又提高了药剂的作用速度。本着快捷、方便、节省药剂的原则,选用培养皿封膜法作为试验方法。

二斑叶螨在逆境时会产生不动的假死症状,但轻碰后会又重新活跃。玻片浸渍法通常是在检查时,用毛笔轻轻触及螨体,肢体不动,无反应者为死亡个体(孟祥梅等,2007)。培养皿封膜法进行试验时,由于是短时间内测定死亡率,此时螨体死亡不彻底,无法以完全不动作为判断标准。因此,检查结果时,用毛轻触螨体,碰后活动活跃的为活虫,活动缓慢且反应迟钝的即为死虫。

培养皿封膜法的4个观察时间结果比较发现,1 h时各浓度处理后的二斑叶螨死亡差异不明显;2 h时,试虫死亡不够彻底,多数为碰后会动的状态,无法准确的界定试虫是否死亡;处理后3 h,各浓度死亡有明显的梯度,而且死虫和活虫较易区分;4 h更明确。阿维菌素是在药后2~3 h时杀虫效果达到最高峰。综合考虑,决定采取药后3 h作为观察时间。

培养皿封膜法于处理后3 h观察结果,可以快速准确的测定二斑叶螨对阿维菌素的敏感性。培养皿封膜法方便、快捷、省时、省力,简便易行,但对于其它杀螨剂的敏感性测定还需要进一步摸索具体方法。

参考文献 (References)

- FAO, 1980. Recommended methods for measurement of pest resistance to pesticides. FAO plant production and protection paper. 21.
- Herron GA, Rophail J, Wilson LJ, 2001. The development of bifenthrin resistance in two-spotted mite (Acari: Tetranychidae) from Australian cotton. *J. Exp. Appl. Acarol.*, 25(4):301-310.
- Shotkoski FA, Mayo ZB, Peters LL, 1990. Induced disulfoton

resistance in greenbugs (Homoptera: Aphididae). *J. Econ. Entomol.*, 83(6):2147-2152.

Shufran RA, Wilde GE, Sloderbeck PE, 1997. Response of three greenbug (Homoptera: Aphididae) strains to five organophosphorous and two carbamate insecticides. *J. Econ. Entomol.*, 90(2):283-286.

Zhu KY, Gao JR, 1998. Kinetic properties and variability of esterases in organophosphate-susceptible and-resistant greenbugs, *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae). *J. Pestic. Biochem. Physiol.*, 62(2):134-145.

Zhu KY, Gao JR, Starkey SR, 2000. Organophosphate resistance mediated by alterations of acetylcholinesterase in a resistant clone of the greenbug, *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae). *J. Pestic. Biochem. Physiol.*, 68(3):138-147.

高新菊, 谢谦, 杨顺义, 张志刚, 王文如, 沈慧敏, 2010. 抗甲氰菊酯二斑叶螨种群对12种杀螨剂的抗药性及交互抗性. *甘肃农业大学学报*, 45(2):114-120.

鲁艳辉, 杨婷, 高希武, 2009. 禾谷缢管蚜和麦长管蚜玻璃管药膜法敏感毒力基线的建立. *昆虫学报*, 52(1):52-58.

孟祥梅, 周玉书, 郭崇友, 2007. 二斑叶螨对阿维菌素抗性和敏感品系相对适合度的研究. *植物保护*, 33(2):55-57.

任健, 周玉书, 赵玉伟, 孟祥梅, 2006. 二斑叶螨对阿维菌素的抗药性预测研究. *中国农学通报*, 22(2):337-338.

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楚18种杀螨剂交互抗性. *植物保护*, 37(1):82-85.

赵卫东, 王开运, 姜兴印, 仪美芹, 2001. 二斑叶螨对常用杀螨剂的抗药性测定. *农药学报*, (3):86-88.