

小菜蛾抗药性监测方法——叶片药膜法^{*}

郭磊¹ 边全乐² 张宏军³ 高希武¹ 梁沛^{1**}

(1. 中国农业大学昆虫学系 北京 100193; 2. 农业部人力资源开发中心 北京 100026; 3. 农业部农药检定所 北京 100026)

摘要 小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 是重要的十字花科蔬菜害虫。生物测定是进行害虫抗药性监测及筛选有效防治药剂的重要技术。本文对小菜蛾的生物测定技术进行了详细总结, 以期小菜蛾等鳞翅目害虫幼虫生物测定方法的规范提供依据。

关键词 小菜蛾, 生物测定, 叶片残留药膜法

Bioassay technique for *Plutella xylostella*: Leaf-dip method

GUO Lei¹ BIAN Quan-Le² ZHANG Hong-Jun³ GAO Xi-Wu¹ LIANG Pei^{1**}

(1. Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 2. Human Resource Development Center, Ministry of Agriculture, the People's Republic of China, Beijing 100026, China; 3. Institute for the Control of Agrochemicals, Ministry of Agriculture, the People's Republic of China, Beijing 100026, China)

Abstract The diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.), is a notorious pest insect of cruciferous vegetables. Bioassays are an important technique for insecticide resistance monitoring and for screening the effectiveness of insecticides. This paper describes in detail the extensively used leaf dipping method in the DBM bioassay so as to provide a standard bioassay method for DBM and other lepidopterous pest insects.

Key words *Plutella xylostella*, bioassay, leaf-dip method

小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 是世界范围内对十字花科蔬菜危害最严重的害虫之一, 全世界每年由于小菜蛾危害造成的经济损失达 40 ~ 50 亿美元 (Zalucki *et al.*, 2012)。依赖于杀虫药剂的化学防治目前仍是控制小菜蛾的主要手段。但由于杀虫药剂的大量不合理使用, 尤其在热带、亚热带地区, 小菜蛾常年处于杀虫药剂胁迫之下, 导致其对几乎所有使用过的杀虫药剂都产生了抗性。根据节肢动物抗药性数据库 (APRD, 2012), 到目前为止, 小菜蛾已对 82 种不同有效成分的杀虫药剂产生了不同程度的抗性。即使具有全新作用机制的双酰胺类杀虫药剂 (如氯虫苯甲酰胺), 在使用不到两年时间, 也已经产生了 12 倍的抗性 (胡珍娣等, 2011), 至 2012 年田间种群抗性已达 606 ~ 2 000 倍 (胡珍娣等, 2012; Wang *et al.*, 2012)。

害虫抗药性监测是进行抗药性有效治理的重要基础。在小菜蛾抗药性监测技术方面, 除了传

统的生物测定技术外, 还有基于不敏感乙酰胆碱酯酶鉴定 (王靖等, 1997) 和羧酸酯酶活性测定的生化监测技术 (Moharil *et al.*, 2008) 及基于普通 PCR 或荧光定量 PCR 的抗性基因点突变检测技术 (Kwon *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2012; Troczka *et al.*, 2012)。但不论是生化检测还是抗性基因检测, 都只适用于某一种或某一类杀虫药剂抗性的监测, 而且其监测结果也只能反映田间种群中抗性个体所占的频率, 而无法准确反映种群的抗性程度。而生物测定结果则不仅能反映害虫对哪些杀虫药剂产生了抗性, 而且能准确给出抗性程度, 因而对于及时调整抗性治理策略更具有实践意义。

关于小菜蛾幼虫的生物测定技术主要有叶片残留药膜法 (Shelton *et al.*, 1993)、点滴法 (Alizadeh *et al.*, 2012) 及 Potter 喷雾塔法 (Jallow and Hoy, 2006) 等。其中点滴法因为需要精确的

^{*} 资助项目: 国家自然科学基金 (31171873); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201203038) 及 863 课题 (2012AA101502)。

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

收稿日期: 2013-02-06, 接受日期: 2013-02-21

点滴器,同时要求操作人员有较高的技术,因此应用不多。而喷雾法同样因为需要专门的喷雾设备(Potter 喷雾塔),不适合田间种群抗性的快速测定,所以应用更少。叶片残留药膜法则因为其操作简便、易于实施,且对触杀性和胃毒性药剂都适用,因而在小菜蛾生物测定中得到广泛应用。但不同的研究人员根据自己的实际情况,或多或少对该方法都做了一定的修改。生物测定方法不同,其结果就必然存在一定差异。作者根据多年从事小菜蛾生物测定的实践,现将小菜蛾生物技术进行标准化,以期为国内同行进行小菜蛾室内毒力测定及田间抗性监测提供统一的技术,从而使不同研究人员的测定结果具有可比性,为全国不同地区小菜蛾抗药性准确评价提供技术支持。

1 叶片残留药膜法

该方法主要包括 5 个步骤。

1.1 生测前的准备

1) 准备滤纸:将普通滤纸剪成直径为 9 cm 的纸碟备用。

2) 培养皿:取直径 9 cm 的塑料培养皿若干(具体数量根据生测设置的药剂浓度数及重复数确定,一般设置 6 个浓度,另设一个对照共 7 组,每组 3 个重复,则共需 21 个培养皿),洗净、晾干后,将准备好的滤纸放于培养皿底部,确保平整。

3) 准备甘蓝叶片:取自己种植的甘蓝或市场上购买的叶片比较平整的甘蓝,将叶片剪下,于清水中加适量洗洁精泡 20 ~ 30 min,再用试管刷或牙刷仔细刷洗叶片正反两面,力度适当,既要破坏甘蓝叶片表面蜡层,又不损伤其叶肉组织,目的是破坏叶片表面蜡层,以利于药剂均匀浸润叶片。用清水冲洗干净后悬挂自然晾干。将晾干后的甘蓝叶片用干净剪刀剪成直径 8 cm 左右的叶碟(尽量避免使用主脉部分),每个浓度准备 3 个叶碟。

1.2 叶片浸药

1) 配制 0.1% 曲拉通(Triton X-100)溶液:加 1 mL Triton X-100 于 1 000 mL 蒸馏水中,充分振荡,使其充分溶解。该溶液主要用于杀虫药剂原药所配制的母液的稀释。

2) 根据预实验结果,确定要配制的杀虫药剂梯度数及浓度范围。以配制 6 个浓度梯度为例:取 7 个 250 mL 的烧杯,将预先用有机溶剂配制的

杀虫药剂母液用 0.1% 曲拉通溶液稀释,由低到高依次配制 6 个不同的浓度(烧杯上标明相应浓度,以免混淆),每个浓度配制 200 mL 药液。第 7 个烧杯加 200 mL 0.1% 曲拉通作为对照。

3) 将准备的叶碟浸入配制好的药液中 10 s,取出于阴凉通风处悬挂晾干至叶片表面无残留液滴即可。先浸对照组,然后再由低浓度到高浓度依次进行。

4) 在培养皿的滤纸上均匀滴加 3 ~ 5 滴蒸馏水(用于叶片保湿。环境中相对温度大于 70% 时则不用加水)。将晾干的浸药叶片放入培养皿中,并在培养皿盖及底部背面注明药剂浓度和实验的日期、时间。

1.3 接入试虫

选取个体大小一致、健康的 3 龄初期幼虫,利用幼虫吐丝的习性,以毛笔挑入培养皿中的叶片上。每个培养皿接入 15 ~ 20 头幼虫。每个浓度设置至少 3 个重复。接完试虫培养皿统一放回小菜蛾的正常饲养环境中,依据试验药剂的特性在处理相应的时间检查死亡率。

1.4 结果检查

常用杀虫药剂对小菜蛾进行毒力测定时的死亡判断标准及处理后检查结果的时间见表 1。

1.5 数据处理

所得数据用 POLO 软件(LeOra Software Inc., California, USA)或 SAS 软件计算毒力回归方程的斜率值($Slope \pm SE$)、 LC_{50} 及其 95% 置信限及卡方值(χ^2)等。

2 注意事项

应用叶片残留药膜法测定杀虫药剂对小菜蛾的毒力时,有以下几点需要注意:

1) 在清洗甘蓝叶片过程中,刷洗叶片的力度一定要掌握好。用力过小则不能破坏叶片表面的蜡层,导致浸药时药液在叶片表面分布不均匀;用力过大则易损伤叶肉,引起叶片失水,在生测过程中萎蔫,从而影响试虫取食,给生测结果造成误差。

2) 配制不同浓度的杀虫剂溶液时,如果母液浓度过高,导致配制应用液时所取母液体积过小(如小于 10 μ L),会导致取样误差加大,使配制的

表 1 不同类型杀虫药剂毒力测定中小菜蛾死亡标准及死亡率统计时间
Table 1 Standard of death and time for mortality record for the bioassay of
different groups insecticides with *Plutella xylostella*

杀虫剂类型 Types of insecticide	代表性药剂 Representative insecticides	死亡标准 Standard of death	统计死亡率时间 Time for mortality recording	参考文献 References
有机磷类	辛硫磷、毒死蜱、乙酰 甲胺磷	试虫触碰不动	24 h	Sun <i>et al.</i> , 2012
氨基甲酸酯类	灭多威、残杀威	试虫触碰不动	24 h	Sun <i>et al.</i> , 2012
拟除虫菊酯类	高效氯氰菊酯、溴氰菊 酯	试虫触碰不动	48 h	Sun <i>et al.</i> , 2012
芳基吡咯类	虫螨腈	试虫触碰不动	48 h	Sun <i>et al.</i> , 2012
双酰胺类	氯虫苯甲酰胺、氟虫双 酰胺	试虫触碰不动	48 h	Wang <i>et al.</i> , 2010, 2012
生物源类	多杀菌素、阿维菌素	试虫触碰不动	72 h	Shelton <i>et al.</i> , 2000; Zhao <i>et al.</i> , 2002
双酰胺类	虫酰胺、甲氧虫酰胺、 呋喃虫酰胺	试虫触碰不动,或虫体 畸形,或体长小于对照 试虫的 30%	96 h	Cao and Han, 2006; Sun <i>et al.</i> , 2010, 2012
苯甲酰胺类	氟铃脲、除虫脲	试虫触碰不动,或虫体 畸形	120 h	吴青君等, 1998; Sun <i>et al.</i> , 2012
Bt 类	Bt 制剂、Bt 毒素	轻触试虫腹部末端,头 部不能摆动、不能向前 爬动	120 h	Liu and Tabashnik, 1997; 王崇利等, 2006

药液浓度不准确。因此可以先配制较高浓度的药液,再稀释到所需浓度,以减小误差。

3) 浸完药液的叶片晾干时间要以叶片表面无残留液滴为准(一般 0.5 ~ 1.0 h)。时间太短,药液未完全晾干,叶片表面尤其是折皱部分残存的部分药液会直接将试虫淹死,使测定的 LC₅₀ 值偏小;晾干时间太长,则易导致叶片脱水、萎蔫,影响试虫取食,同时也会造成部分药剂降解,使测定的 LC₅₀ 值偏大。

4) 给培养皿中滤纸加水要根据环境条件变化灵活掌握。如果空气干燥,可适当多加,以刚好使整个滤纸均匀湿润为好(最多 100 μL)。如遇到连阴雨或南方梅雨季节,空气湿度大,则可不加水,以免湿度过大,叶片发霉腐烂,引起试虫死亡。

5) 试虫以 3 龄初幼虫为佳。不同龄期的幼虫,甚至同一龄期不同阶段的幼虫对同一药剂的敏感度都存在较大差异,因此应选择发育阶段统一的试虫,以保证不同研究人员得到的生物测定

结果具有可比性。小菜蛾不同龄期幼虫的形态见图 1。每个龄期初期的幼虫,其头壳颜色发白,且与前胸结合接触紧密,比较活跃。此后随时间延长,头壳很快出现褐斑最后全部变为深褐色,体色也逐渐加深,体长及体重明显增加。到末期时,幼虫进入头壳蜕裂期,头壳与前胸分离,前胸前部颜色明显发白,基本静止不动,停止取食。由于小菜蛾幼虫个体较小,不同龄期的幼虫不易区分,为避免生物测定时选取的试虫发育阶段出错,以室内饲养 4 年左右的小菜蛾品系为样本,测定了其 2 ~ 4 龄初期幼虫的平均体长及体重(表 2)。由于不同种群其个体大小可能存在差异,表 2 所列数据仅供参考。

6) 如果对照组的自然死亡率大于 20%,则非药剂因素引起的死亡率偏高,本次生物测定应该重新做。

7) 叶片残留药膜法同样也适用于其他鳞翅目幼虫的生物测定。

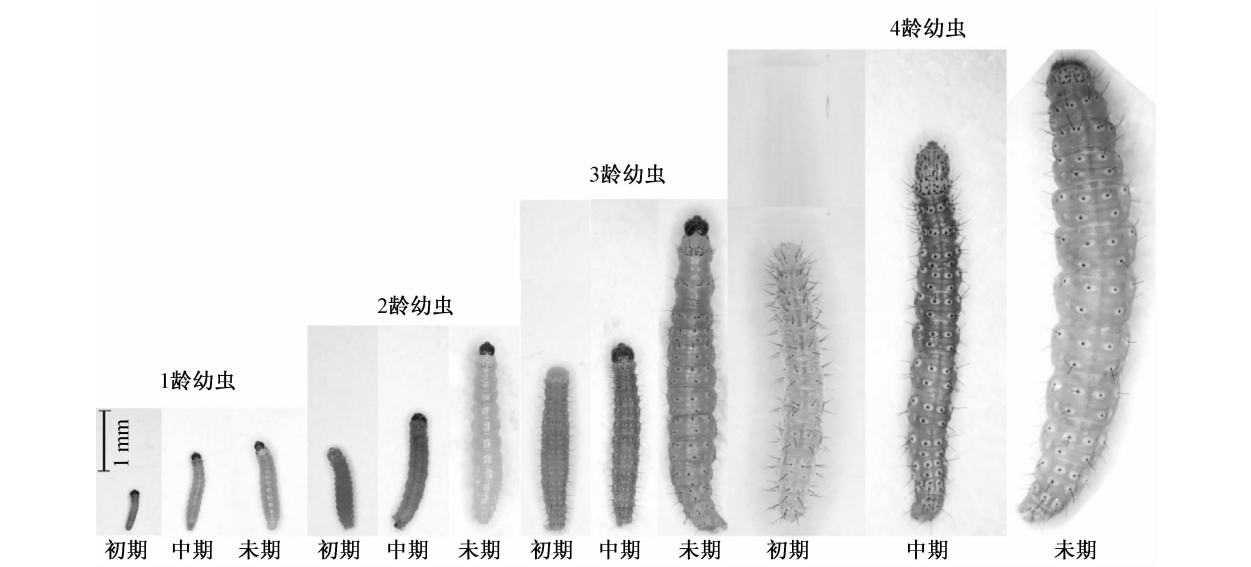


图 1 不同发育阶段的小菜蛾幼虫

Fig.1 Various instar larvae of *Plutella xylostella*

表 2 小菜蛾 2~4 龄初幼虫的平均体长及体重

Table 2 Average body length and weight of 2nd to 4th instar neonate larvae of *Plutella xylostella*

	2 龄初幼虫 2nd instar larvae	3 龄初幼虫 3rd instar larvae	4 龄初幼虫 4th instar larvae
体长 Body length(mm)	1.30 ± 0.13	2.91 ± 0.25	4.71 ± 0.23
体重 Body weight((g)	90.6 ± 34.4	333.3 ± 50.7	1370 ± 81.9

参考文献 (References)

Alizadeh M, Karimzadeh J, Rassoulilian GR, Farazmand H, Hoseini-Naveh V, Pourian HR, 2012. Sublethal effects of pyriproxyfen, a juvenile hormone analogue, on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae): life table study. *Arch Phytopathol. Plant Prot.*, 45(14):1741 – 1763.

APRD, 2012. Arthropod Pesticide Resistance Database. East Lansing; Michigan State Univ. <http://www.pesticideresistance.com/index.php5a>.

Cao GC, Han ZJ, 2006. Tebufenozide resistance selected in *Plutella xylostella* and its cross-resistance and fitness cost. *Pest Manag. Sci.*, 62:746 – 751.

Jallow MF, Hoy CW, 2006, Quantitative genetics of adult behavioral response and larval physiological tolerance to permethrin in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.*, 99(4):1388 – 1395.

Kim JL, Joo YR, Kwon M, Kim GH, Lee SH, 2012. Mutation in *acel* associated with an insecticide resistant population of *Plutella xylostella* (Special Issue: From gene to ecosystem: identification, behavior and modeling in insect science). *J. Asia-Pacific Entomol.*, 15(3):401 – 407.

Kwon DH, Clark JM, Lee SH, 2004. Estimation of knockdown resistance in diamondback moth using real-time PASA. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 78(1):39 – 48.

Liu Y, Tabashnik BE, 1997. Inheritance of resistance to the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1C in the diamondback moth. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(6):2218 – 2223.

Moharil MP, Wadegaonkar PA, Rao NG, Tikar VSN, Rai MK, Nimbalkar SA, 2008. Detection of a carboxylesterase-mediated resistance mechanism in *Plutella xyloestella* (L.) by diagnostic microplate assay. *Res. J. Agricult. Biol. Sci.*, 4(6):623 – 629.

Shelton AM, Robertson JL, Tang JD, Perez C, Eigenbrode SD, Preisler HK, Wilsey WT, Cooley RJ, 1993. Resistance of diamondback moth (Lepidoptera: Yponomeutidae) to *Bacillus thuringiensis* subspecies in the field. *J. Econ. Entomol.*, 86:697 – 705.

Shelton AM, Sances FV, Hawley J, Tang JD, Boune M, Jungers D, Collins HL, Farias J, 2000. Assessment of

- insecticide resistance after the outbreak of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) in California in 1997. *J. Econ. Entomol.*, 93(3):931–936.
- Sun JY, Liang P, Gao XW, 2010. Inheritance of resistance to a new non-steroidal ecdysone agonist, fufenozide, in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Pest Manag. Sci.*, 66:406–411.
- Sun JY, Liang P, Gao XW, 2012. Cross-resistance patterns and fitness in fufenozide-resistant diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Pest Manag. Sci.*, 68:285–289.
- Trocza B, Zimmer CT, Elias J, Schorn C, Bass C, Davies TGE, Field LM, Williamson MS, Slater R, Nau R, 2012. Resistance to diamide insecticides in diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) is associated with a mutation in the membrane-spanning domain of the ryanodine receptor. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 42(11):873–880.
- Wang XL, Khakame SK, Ye C, Yang YH, Wu YD, 2012. Characterisation of field-evolved resistance to chlorantraniliprole in the diamondback moth, *Plutella xylostella*, from China. *Pest Manag. Sci.*, doi: 10.1002/ps.3422.
- 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.
- Zalucki MP, Shabbir A, Silva R, Adamson D, Liu SS, Furlong MJ, 2012. Estimating the economic cost of one of the world's major insect pests, *Plutella xylostella*: Just how long is a piece of string? *J. Econ. Entomol.*, 105:1115–1129.
- Zhao JZ, Li YX, Collins HL, Gusukuma-Minuto L, Mau RF, Thompson GD, Shelto AM, 2002. Monitoring and characterization of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to spinosad. *J. Econ. Entomol.*, 95(2):430–436.
- 胡珍娣, 陈焕瑜, 李振宇, 张德雍, 尹飞, 林庆胜, 包华理, 周小毛, 冯夏, 2012. 华南小菜蛾田间种群对氯虫苯甲酰胺已产生严重抗性. *广东农业科学*, 39(1):79–81.
- 胡珍娣, 冯夏, 李振宇, 张德雍, 陈焕瑜, 2010. 不同小菜蛾田间种群对氯虫苯甲酰胺药剂的敏感性. *农药研究与应用*, 14(3):25–27.
- 王崇利, 武淑文, 杨亦桦, 吴益东, 2006. 东南沿海地区小菜蛾对 Bt δ -内毒素和 Bt 制剂的抗性检测. *昆虫学报*, 49(1):70–73.
- 王靖, 袁家珪, 孙耘芹, El-Said FA, 1997. 小菜蛾抗性个体不敏感乙酰胆碱酯酶的鉴定. *昆虫学报*, 40(2):128–134.
- 吴青君, 朱国仁, 赵建周, 张兴, 高希武, 1998. 小菜蛾对定虫隆抗性种群的选育及交互抗性研究. *昆虫学报*, 41(增):34–41.

杀虫药剂田间药效试验方法^{*}

孙璟琰¹ 边全乐² 张宏军³ 高希武^{1**}

(1. 中国农业大学昆虫学系 北京 100193; 2. 中国农学会 北京 100026; 3. 农业部农药检定所 北京 100026)

摘要 杀虫药剂田间药效试验是客观评价杀虫药剂药效的重要依据。本文对杀虫药剂田间药效试验的设计、试验小区划分、杀虫药剂配制和施用、取样、结果调查和分析方法进行了规范性综述,为进行标准的田间药效试验提供依据和参考。

关键词 杀虫药剂,田间药效试验,害虫

Insecticide field efficacy trials

SUN Jing-Yan¹ BIAN Quan-Le² ZHANG Hong-Jun³ GAO Xi-Wu^{1**}

(1. Department of Entomology, China Agricultural University Beijing 100193, China; 2. Chinese Association of Agricultural Science Societies, Beijing 100026, China; 3. Institute for the Control of Agrochemicals, Ministry of Agriculture, the People's Republic of China, Beijing 100026, China)

Abstract Field efficacy trials are important to evaluate the effectiveness of insecticides. Here we review the methods of insecticide field efficacy trials, including trial design, experimental plot design, insecticide application, sample selection and analysis of results. We provide a reference for standardization of procedures for such trials.

Key words insecticide, field efficacy trial, insect

随着农药科学的快速发展,不断有新杀虫药剂面世。在新杀虫药剂推广之前,必须在大田自然环境条件下进行田间药效试验,客观地对杀虫药剂的应用效果、应用范围、应用前景进行评价。根据试验数据计算杀虫药剂对害虫的防治效果,同时对数据进行统计分析,为杀虫药剂药效的评价提供有效的数据,从而明确杀虫药剂在不同的自然条件、生产条件下的效果和使用技术(李剑敏,2002)。

田间药效试验为农药生产企业办理农药登记提供资料,为登记和推广应用提供科学依据。同时也对杀虫药剂对害虫的田间防治效果比较提供指导。为了得到真实、可靠、可重复的试验结果,制定合理的杀虫药剂田间试验方法至关重要。

1 田间药效试验设计的原则

盖钧镒(2000)提出了试验应该遵循的三项基本原则。一是重复原则:试验中同一处理的小区

数即为重复次数。重复的作用是用来估计误差和降低试验误差以提高试验的精确度;二是随机排列原则:随机排列是指一个区组中每一处理都有同等的机会设置在任何一个试验小区上,从而避免任何主观成见;三是局部控制原则:田间试验设置重复的目的是降低误差,但是增加了重复也相应地增加了整个试验田面积,必然会增加土壤差异。所以将试验田按照重复次数划分为相同数目的区组,这样实验误差的来源只限于去组内较小地段的微小土壤差异,而与因增加重复而扩大试验田所增大的土壤差异无关。

2 田间药效试验的步骤

杀虫药剂田间药效试验一般由田间试验小区规划、药剂配制、取样、试验结果调查和试验数据处理及统计分析 5 个部分组成。

2.1 田间试验小区规划

2.1.1 试验区选择 试验区的选择是保证试验

* 资助项目:国家大麦青稞产业技术体系和公益性行业(农业)科研专项(200903033)。

**通讯作者, E-mail: gaowu@263.net.cn

收稿日期:2013-02-06,接受日期:2013-03-11