

二斑叶螨对螺螨酯的抗性选育 及其解毒酶活性测定*

李忠洲** 周玉书*** 朴静子 田如海 高 萍

(沈阳农业大学植物保护学院 沈阳 110866)

摘 要 用螺螨酯对二斑叶螨 *Tetranychus urticae* Koch 进行 35 代抗性选育, 抗性指数达到 8.34, 并在选育过程中, 对二斑叶螨解毒酶的活性进行测定。结果表明, 随着选育代数的增加, 抗性增强, 细胞色素 P450 活性亦显著提高, 而羧酸酯酶、谷胱甘肽转移酶活性较敏感品系差异不显著。说明二斑叶螨对螺螨酯抗药性的增强与其体内细胞色素 P450 活性的增强有关。

关键词 二斑叶螨, 螺螨酯, 抗药性, 解毒酶活性, 杀螨剂

Determination of selection for resistance to spiroticlofen and its effect on detoxification enzymes in *Tetranychus urticae*

LI Zhong-Zhou** ZHOU Yu-Shu*** PIAO Jing-Zi TIAN Ru-Hai GAO Ping

(Plant Protection College, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract Selection of the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) for resistance to spiroticlofen and its effect on detoxification enzymes were investigated. After 35 generations of continuous selection, resistance to spiroticlofen was > 8.34 that of the original susceptible strain. O-demethylase activity of the F_{35} generation was significantly higher than that of the F_0 generation. There was, however, no obvious difference in glutathione S-transferase or carboxy lesterase activity between the resistant and susceptible strains. We conclude that the resistance of *T. urticae* to spiroticlofen is related to enhancement of O-demethylase activity.

Key words *Tetranychus urticae*, spiroticlofen, resistance, activity of detoxifying enzymes, acaricides

二斑叶螨 *Tetranychus urticae* Koch 属于节肢动物门, 蛛形纲, 蜱螨目, 叶螨科, 叶螨属, 是一种世界性害螨。目前对二斑叶螨的防治, 仍以化学药剂为主, 由于螨体微小、世代历期短、抗逆性强、繁殖力强的特点, 该螨极易对药剂产生抗药性(周玉书等, 2006; Kwon *et al.*, 2010)。

螺螨酯是拜耳作物科学有限公司开发的一种季酮酸类全新作用机制的高效低毒杀螨剂, 是通过抑制害螨体内的脂肪合成, 破坏螨虫的能量代谢活动, 最终杀死害螨。它的杀螨机制完全不同于现有的各种杀螨剂, 可以用来防治多种害螨, 且对有益生物及环境十分安全, 所以具有很好的应

用前景(Raudonis, 2006; 何晓敏等, 2010; 孙瑞红等, 2010)。目前该药剂在我国尚未广泛应用。因此, 有必要明确二斑叶螨对螺螨酯的抗性发展动态, 为指导生产合理使用农药延缓抗性产生提供参考。

本研究旨在探讨二斑叶螨对螺螨酯产生抗性与解毒酶活力变化的关系, 为进一步研究抗性机理提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试二斑叶螨

二斑叶螨敏感品系(S)是 1991 年采自甘肃省

* 资助项目: 辽宁省教育厅项目(2009S094)。

** E-mail: lizhongzhou123456@163.com

*** 通讯作者, E-mail: zhouys102@163.com

收稿日期: 2012-01-13, 接受日期: 2012-03-08

天水市果树研究所,此后一直在恒温养虫室内不接触任何药剂的条件下,用盆栽菜豆连续饲养 400 余代,可视为相对敏感品系。二斑叶螨抗性品系(R)是由敏感品系经 35 代室内抗性汰选而来,其抗性指数为 8.34。

1.2 供试药剂

240 g/L 螺螨酯悬浮剂(拜耳作物科学中国有限公司)。

1.3 试剂

还原型谷胱甘肽(GST)和还原型辅酶Ⅱ(NADPH),分析纯,Sigma 进口;1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)和 α -乙酸萘酯,化学纯,沈阳化学试剂厂;对-硝基茴香醚和对硝基苯酚,分析纯,上海宝曼生物科技有限公司;磷酸氢二($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$);磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); α -萘酚;丙酮;1%固蓝 B 盐;5%十二烷基硫酸钠;牛血清白蛋白;考马斯亮蓝 G-250;三羟甲基氨基甲烷(tris);盐酸;氯化钾;乙二胺四乙酸(EDTA);氢氧化钠;无水乙醇;毒扁豆碱等为分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.4 方法

1.4.1 毒力测定 参照 FAO(1980)推荐的叶片残毒法。采集平整的菜豆叶片,净化后剪成 2 cm × 2 cm 小方块,叶面朝下放在水隔离饲养台上,每块叶片挑接雌成螨 25 头,置于 24℃ 条件下,任其产卵 6 h,去除雌成螨,每一处理 4 块叶片,共计卵数在 100 粒以上,待卵孵化为幼螨后,在预备试验的基础上将供试药剂配制成 5 个浓度处理,将带幼螨的叶片浸入各处理药液 5 s,取出凉干后叶面朝下放到水隔离饲养台上,再重新检查记录幼螨数,以此次记录作为供试螨数。以清水作对照,每浓度 4 次重复。以后每天观察一次幼、若螨的死亡情况并做记录,待对照组的幼螨全部发育至成螨时,统计各处理的死亡率,再用 Abbott(1925)公式校正。

1.4.2 抗性选育 先以敏感种群幼螨的毒力回归方程为基础(周玉书等,2011),以杀死种群 50% ~ 60% 的剂量逐代汰选,用小型手持喷雾器喷洒药剂,喷药 48 h 后将存活二斑叶螨转移至新鲜菜豆上,每次汰选施药后,2 d 后记录幼螨死亡率,并用 Abbott 公式校正,待存活种群逐渐恢复后再次喷药。以后每 5 代测定新的毒力回归方程,

再以新的回归方程为依据,继续以杀死种群 50% ~ 60% 的剂量逐代汰选。

1.4.3 细胞色素 P450 O-脱甲基酶比活力测定

参照 Hansen 和 Hodgson(1971)的方法。每世代取雌成螨 200 头,加 1 mL 磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH7.2),冰浴中充分均浆;4℃、10 000 r/min 离心 15 min(高速冷冻离心机,TL-18M,上海市离心机机械研究所),吸取上清液作酶源。取 1.5 mL 反应混合液和 0.5 mL 酶液,加 0.5 mL NADPH,37℃ 水浴 5 min(数显恒温水浴锅,HH-4,国华电器有限公司),加 0.5 mL 对硝基茴香醚,37℃ 水浴震荡 30 min(恒温振荡器,SHA-C,国华电器有限公司),加 1 mL 盐酸终止反应,5 mL 乙醚萃取,弃水相,3 mL 氢氧化钠萃取,取水相,在紫外分光光度计(UV-110、UV/V-1200,上海美谱达仪器有限公司)上,400 nm 处测定 OD 值,每一处理 4 次重复。以对硝基苯酚作标准曲线,根据测定 OD 值,在标准曲线上计算产物生产量。

1.4.4 羧酸酯酶(CarE)比活力测定

参照 Van Asperen(1962)的方法。每世代取雌成螨 200 头,加 1 mL 磷酸缓冲液(0.04 mol/L, pH7.0),冰浴中充分均浆;4℃、10 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液酶源。取 α -乙酸萘酯 10 mL,25℃ 平衡 5 min,加 2 mL 酶液,37℃ 水浴 30 min,立刻加 2 mL 显色剂,待颜色稳定后,在紫外分光光度计上,600 nm 处测定 OD 值,每一处理 4 次重复。以 α -萘酚作标准曲线,根据测定 OD 值,在标准曲线上计算产物生产量。

1.4.5 谷胱甘肽 S-转移酶(GST)比活力测定

参照 Kao 等的(1989)方法。每世代取雌成螨 200 头,加 1 mL 磷酸缓冲液(0.066 mol/L, pH7.0),冰浴中充分匀浆;4℃、10 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液作酶源。取缓冲液、谷胱甘肽、1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)、酶液 2.4、0.3、0.1、0.2 mL,对照不加酶液。25℃ 水浴 35 min,在紫外分光光度计上,340 nm(石英比色皿)处测定 OD 值,每一处理 4 次重复。

1.4.6 蛋白质含量的测定

蛋白质标准曲线的制作:取 6 支试管按表 1 顺序加入试剂,静置 2 min,在 595 nm 下比色测定。牛血清蛋白的含量($\mu\text{g/mL}$)为横坐标,以 OD 值为纵坐标,绘制标准曲线。

表 1 标准曲线的制作——考马斯亮蓝 G-250 染色法 (mL)

Table 1 Standard curve prepared by the staining method of coomassie brilliant blue G-250 (mL)

试剂 (mL) Reagent	试管编号 Treatment number					
	0	1	2	3	4	5
标准牛血清蛋白 Standard bovine serum albumin	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
蒸馏水 Distilled water	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0
考马斯亮蓝 Coomassie brilliant blue	5	5	5	5	5	5

蛋白质含量测定:参照 Bradford (1976) 的考马斯亮蓝 G-250 染色法。每世代取雌成螨 200 头,加 1.5 mL 磷酸缓冲液 (0.1 mol/L, pH7.4),冰浴中充分匀浆,4℃,10 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液稀释 10 倍作酶源,每一处理 4 次重复。取酶液 1 mL,加考马斯亮蓝溶 5 mL,水浴 2 min,在紫外分光光度仪上,595 nm 处测 OD 值从蛋白质标准曲线上查出样品对应的蛋白含量。

1.4.7 数据处理 均采用 Excel, DPS 软件进行统计分析 (唐启义和冯明光, 2002)。

2 结果与分析

2.1 二斑叶螨对螺螨酯的抗药性选育结果

由表 2 可知,随着抗性选育代数的增加,LC₅₀ 值逐渐增大,抗性水平不断提高。在选育初期 (F₀ ~ F₅ 代),抗性发展变化不大;由 F₅ 代抗性发展开始加快,但直到 F₂₀ 代抗性指数才达到 4.48,抗性并不明显;从 F₂₀ 代到 F₃₅ 代抗性增长较快。经 35 代人工汰选,二斑叶螨对螺螨酯的敏感性显著下降,即 LC₅₀ 由选育前的 15.1252 mg/L 上升至选育

表 2 螺螨酯对二斑叶螨不同汰选世代的毒力测定结果

Table 2 Result of toxicity testing after selection by spiroticlofen in *Tetranychus urticae*

世代 Generation	毒力回归方程 (y =) LC-P equation	相关系数 Correlation	LC ₅₀ mg/L	抗性倍数 Resistance ratio
F ₀	3.2561x + 1.1587	0.986	15.1252 ± 0.0398	1.00
F ₅	1.8236x + 2.6016	0.989	20.6633 ± 0.0641	1.36
F ₁₀	1.9234x + 1.8790	0.986	41.9373 ± 0.0553	2.77
F ₁₅	2.1406x + 1.3709	0.994	49.5907 ± 0.0508	3.28
F ₂₀	2.1566x + 1.0517	0.941	67.7485 ± 0.0511	4.48
F ₂₅	2.9739x + 0.7287	0.952	84.3918 ± 0.0376	5.58
F ₃₀	1.7784x + 1.4460	0.959	106.8747 ± 0.0465	7.07
F ₃₅	2.6052x - 0.4832	0.966	125.8925 ± 0.3838	8.34

后的 125.8925 mg/L,达 8.34 倍,形成较为明显的抗性。

2.2 选育种群不同世代细胞色素 P450 O-脱甲基酶的活性变化

由表 3 可知,随着选育代数的增加,细胞色素 P450 O-脱甲基酶的活性不断增强,F₃₅ 代是 F₀ 代的 1.75168 倍,差异显著 (P < 0.05),且从 F₃₀ 代开始细胞色素 P450 O-脱甲基酶的活性上升幅度较大。说明二斑叶螨对螺螨酯抗性水平的提高可能

与细胞色素 P450 O-脱甲基酶活性的增强有直接关系。

2.3 选育种群不同世代羧酸酯酶的活性变化

由表 4 可知,羧酸酯酶的活性变化不明显,F₃₅ 代是 F₀ 代的 1.25374 倍,差异不显著 (P < 0.05);从 F₀ 代到 F₃₅ 代羧酸酯酶的活性虽一直处于平稳上升当中,但上升幅度不大。说明二斑叶螨对螺螨酯抗性水平的提高可能部分与羧酸酯酶活性的提高有关。

表 3 螺螨酯对二斑叶螨不同汰选世代细胞色素 P450 O-脱甲基酶的比活力变化

Table 3 Changes of O-demethylase of cytochrome P450 activity after selection by spiroticlofen in <i>Tetranychus urticae</i>		
世代 Generation	P450 O-脱甲基酶活性 $\mu\text{mol}/(\text{mgPro}\cdot\text{min})$ O-demethylase of cytochrome P450 activity	变化倍数 Relative ratio
F ₀	0. 00224 $\pm$ 0. 00031	1. 00000
F ₁₀	0. 00242 $\pm$ 0. 00045	1. 08421
F ₂₀	0. 00260 $\pm$ 0. 00035	1. 16390
F ₃₀	0. 00284 $\pm$ 0. 00097	1. 27257
F ₃₅	0. 00392 $\pm$ 0. 00086	1. 75168

表 4 螺螨酯对二斑叶螨不同汰选世代羧酸酯酶的比活力变化

Table 4 Changes of carboxy lesterase activity after selection by spiroticlofen in <i>Tetranychus urticae</i>		
世代 Generation	羧酸酯酶活性 $\mu\text{mol}/(\text{mgPro}\cdot\text{min})$ Carboxy lesterase activity	变化倍数 Relative ratio
F ₀	0. 22811 $\pm$ 0. 00477	1. 00000
F ₁₀	0. 24516 $\pm$ 0. 00180	1. 07916
F ₂₀	0. 25931 $\pm$ 0. 01664	1. 13766
F ₃₀	0. 26867 $\pm$ 0. 00732	1. 17783
F ₃₅	0. 28470 $\pm$ 0. 00131	1. 25374

2.4 选育种群不同世代谷胱甘肽 S-转移酶的活性变化

由表 5 可知,经过 35 代选育,谷胱甘肽 S-转移酶活性总体变化不大,F₁₀代该酶活性略有下降;

螺螨酯的选育对二斑叶螨谷胱甘肽 S-转移酶没有明显的影响。说明二斑叶螨对螺螨酯抗性水平的提高与该酶关系不大。

表 5 螺螨酯对二斑叶螨不同汰选世代谷胱甘肽 S-转移酶的比活力变化

Table 5 Changes of glutathione S-transferase activity after selection by spiroticlofen in <i>Tetranychus urticae</i>		
世代 Generation	谷胱甘肽 S-转移酶活性 $\text{OD}/(\text{mgPro}\cdot\text{min})$ Glutathione S-transferase activity	变化倍数 Relative ratio
F ₀	1. 19390 $\pm$ 0. 01668	1. 00000
F ₁₀	1. 15335 $\pm$ 0. 02454	0. 98279
F ₂₀	1. 19502 $\pm$ 0. 00214	1. 01772
F ₃₀	1. 21885 $\pm$ 0. 01409	1. 02089
F ₃₅	1. 33718 $\pm$ 0. 02437	1. 08389

2.5 二斑叶螨对螺螨酯的抗药性与 3 种解毒酶的关系

由图 1 可知,随着抗性倍数的提高,细胞色素 P450 O-脱甲基酶的比活力倍数增加显著,尤其是当抗性倍数由 7.07 提高到 8.34 时,比活力倍数由 1.27 增加到 1.75;羧酸酯酶的比活力倍数略有增加,但不显著;谷胱甘肽 S-转移酶的比活力基本没有变化。3 种解毒酶以细胞色素 P450 O-脱甲基酶

的比活力上升幅度最大,羧酸酯酶次之,谷胱甘肽 S-转移酶变化不大。

3 结论与讨论

本研究表明,用螺螨酯经 35 代选育,二斑叶螨对螺螨酯的抗性指数已达 8.34。其前 20 代的抗性指数上升比较缓慢;20 代以后抗性上升较快,且形成比较明显的抗性。Rauch 和 Nauen(2003)

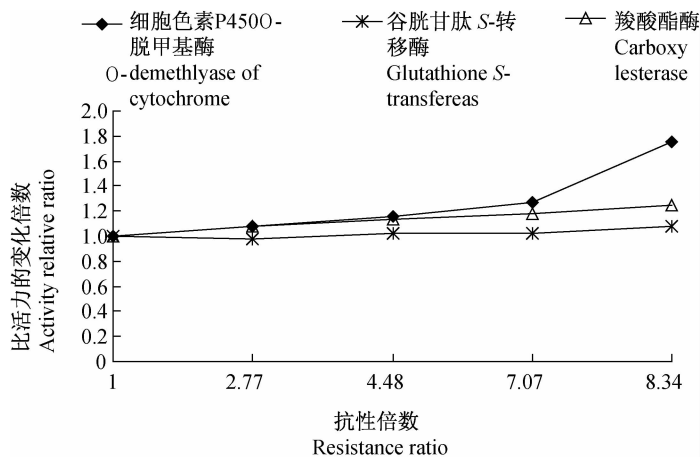


图 1 二斑叶螨对螺螨酯的抗性倍数与 3 种解毒酶比活力倍数的关系

Fig. 1 Relationship to resistance ratio and three detoxification enzymes activities ratio by spiroticlofen in *Tetranychus urticae*

用螺螨酯对二斑叶螨汰选 37 代,其抗性指数达 13。Nauen(2005)研究表明,螺螨酯是一种优秀的杀螨剂,在叶螨类害虫中难以迅速筛选出抗性种群。总体来讲,二斑叶螨对螺螨酯的抗性增长速度比较缓慢。

经螺螨酯选育后,对二斑叶螨不同世代的细胞色素 P450 O-脱甲基酶、羧酸酯酶和谷胱甘肽 S-转移酶活性测定表明,随着选育代数的增加,细胞色素 P450 O-脱甲基酶活性变化最大,选育 35 代是选育前的 1.75617 倍,而且从选育 30 代开始,该酶活性在较高水平上波动。羧酸酯酶活性变化不显著,选育 35 代仅是选育前的 1.25374 倍;谷胱甘肽 S-转移酶活性,基本没有变化。说明二斑叶螨对螺螨酯抗性的提高可能与细胞色素 P450 O-脱甲基酶的活性增强有密切关系,其次是羧酸酯酶,与谷胱甘肽 S-转移酶关系不大。Natascha Rauch 和 Ralf Nauen 对抗性指数达 13 的二斑叶螨抗螺螨酯种群的解毒酶活性测定表明,细胞色素 P450 单加氧酶、羧酸酯酶和谷胱甘肽 S-转移酶分别提高 2.1、1.2、1.2 倍,认为酶活性的提高导致二斑叶螨抗性增加。随着抗性的增加,解毒酶活性可能会有更大的变化,因此本项研究有待今后深入进行。

值得指出的是,仅从生理生化水平上对二斑叶螨的抗性机制研究远远不够,因其结果经常受一些不确定因素的影响。所以,今后的研究工作还应从分子水平上探索其抗性形成和发展的机制,这样不但能完善抗性机制的研究及其主导抗

性机制的确定,也为抗性的前期诊断和抗性治理提供更为可靠的依据。

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 dyebinding. *Anal. Biochem.*, 72:248 - 254.
- FAO, 1980. Revised method for spider mites and their eggs (e. g. *Tetranychus* spp. and *panonychus ulmi* Koch) . *FAO Plant Production and Protection*, 21:49 - 54.
- Hansen LG, Hodgson E, 1971. Biochemical characteristics of insect microsomes; N- and O-demethylation. *Biochem. Pharmacol.*, 20(7):1569 - 1678.
- Kao CH, Fu C, Sun CN, 1989. Parathion and methyl parathion resistance in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) larvae. *J. Econ. Entomol.*, 82(5):1299 - 1304.
- Kwon DH, Seong GM, Kang TJ, Lee SH, 2010. Multiple resistance mechanisms to avamectin in the two-spotted spider mite. *J. Asia-Pac. Entomol.*, 13(3):229 - 232.
- Nauen R, 2005. Spiroticlofen; Mode of action and resistance risk assessment in Tetranychid pest mites. *Pestic. Sci. Soc. Jpn.*, 30(3):272 - 274.
- Rauch N, Nauen R, 2003. Spiroticlofen resistance risk assessment in *Tetranychus urticae* (Acari:Tetranychidae): a biochemical approach. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 74(2): 91 - 101.
- Raudonis L, 2006. Comparative toxicity of spiroticlofen and lambdacihalotrin to *Tetranychus urticae*, *Tarsonemus pallidus* and predatory mite *Amblyseius Andersoni* in a

strawberry site under field conditions. *Agronomy Research*, 4;317 – 322.

Van Asperen K, 1962. A study of housefly esterase by means of a sensitive colorimetric method. *J. Insect Physiol.* , 8; 401 – 416.

何晓敏, 柴宝山, 孙旭峰, 田俊峰, 刘长令, 2010. 季酮酸类杀虫、杀螨剂的研究进展. *农药*, 49(6):391 – 396.

孙瑞红, 王贵芳, 李爱华, 李晓军, 2010. 螺螨酯对山楂叶螨的生物活性和防治效果. *昆虫知识*, 47 (5):968 – 973.

唐启义, 冯明光, 2002. 实用统计分析及 DPS 数据处理系统. 北京:科学出版社. 202 – 203.

周玉书, 朴春树, 仇贵生, 张平, 孟威, 方红, 2006. 不同温度下 3 种实验种群生命表研究. *沈阳农业大学学报*, 37(2):173 – 176.

周玉书, 田如海, 朴静子, 仇贵生, 车午男, 李忠洲, 李修伟, 2011. 240g/L 螺螨酯 SC 对二斑叶螨敏感种群毒力测定. *农药*, 50(2):144 – 145.