

虱螨脲对草地贪夜蛾幼虫的毒力及其几丁质含量和几丁质酶活性的影响*

王增霞^{1**} 周婉^{2**} 何灿¹ 黄保宏¹ 胡飞^{3***}

(1. 安徽科技学院农学院, 滁州 233100; 2. 安徽科技学院资源与环境学院, 滁州 233100;

3. 安徽省农业科学院植物保护与农产品质量安全研究所, 合肥 230031)

摘要 【目的】探究虱螨脲 (Lufenuron) 对草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 的毒力, 明确虱螨脲对草地贪夜蛾生长发育的调控机理, 为虱螨脲在草地贪夜蛾防治上的科学应用提供依据。【方法】通过生物测定法研究虱螨脲对草地贪夜蛾幼虫的毒力, 进一步利用氨基葡萄糖法和 N-乙酰氨基葡萄糖分别测定在亚致死浓度下草地贪夜蛾幼虫体内几丁质含量和几丁质酶活性, 并利用生物信息学分析法从转录组数据库筛选几丁质酶基因进行系统发育分析, 然后利用实时荧光定量 PCR 分析虱螨脲处理对草地贪夜蛾幼虫几丁质酶基因表达量的影响。【结果】经虱螨脲处理后, 草地贪夜蛾幼虫逐渐表现出活动力下降, 蜕皮困难, 最终畸形死亡。虱螨脲处理 96 h 后 LC_{20} 值为 0.517 mg/L, LC_{50} 值为 1.009 mg/L。用亚致死浓度虱螨脲分别处理草地贪夜蛾幼虫 48 h 和 96 h 后, 几丁质含量和几丁质酶活性显著降低。进化树分析结果显示, 从 NR 数据库筛选出的 5 条草地贪夜蛾几丁质酶基因为 5 种不同类型的几丁质酶基因。qPCR 分析结果表明, 虱螨脲在 LC_{20} 浓度下对几丁质酶基因表达有显著的激活作用, 但 LC_{50} 浓度对几丁质酶基因的表达有一定的抑制作用。【结论】虱螨脲对草地贪夜蛾有较强的毒力作用, 能够降低草地贪夜蛾幼虫体内几丁质含量和几丁质酶活性, 且对几丁质酶基因表达具有显著干扰作用。

关键词 草地贪夜蛾; 虱螨脲; 毒力测定; 几丁质; 几丁质酶

Toxicity of lufenuron and its effects on the chitin content and chitinase activity of *Spodoptera frugiperda* larvae

WANG Zeng-Xia^{1**} ZHOU Wan^{2**} HE Can¹ HUANG Bao-Hong¹ HU Fei^{3***}

(1. College of Agriculture, Anhui Science and Technology University, Chuzhou 233100, China; 2. College of Resource and Environment, Anhui Science and Technology University, Chuzhou 233100, China; 3. Institute of Plant Protection and Agro-products Safety, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China)

Abstract 【Objectives】To investigate the toxicity of lufenuron and its effects on the growth and development of *Spodoptera frugiperda* larvae. 【Methods】A bioassay was conducted to investigate the toxicity of lufenuron to *S. frugiperda* larvae and the chitin content and chitinase activity of larvae exposed to sublethal concentrations of lufenuron were measured using the glucosamine, and N-acetylglucosamine methods, respectively. Bioinformatics was used to screen chitinase genes from the transcriptome database for phylogenetic analysis, after which real-time fluorescence quantitative PCR was used to analyze the effect of lufenuron on the expression of these genes. 【Results】Larvae gradually became less active and molting and cuticle development became abnormal. Larvae eventually became deformed and died. The lethal 20% (LC_{20}) and 50% (LC_{50}) concentrations of lufenuron after 96 h were 0.517 mg/L and 1.009 mg/L, respectively. Chitin content and chitinase activity were significantly reduced after 48 h and 96 h exposure to sublethal concentrations of lufenuron. A phylogenetic tree indicates that the five chitinase genes in the NR database are different types. qPCR analysis shows that the LC_{20} concentration

*资助项目 Supported projects: 国家重点研发计划 (2021YFD1400701)

**共同第一作者 Co-First authors, E-mail: wangzengxia100@163.com; eliauk1221@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: hufly0224@163.com

收稿日期 Received: 2022-10-07; 接受日期 Accepted: 2022-12-23

of lufenuron can activate chitinase gene expression, whereas the LC_{50} concentration can inhibit it. **[Conclusion]** Lufenuron reduces chitin content, inhibits chitinase activity and disrupts chitinase gene expression, in *S. frugiperda* larvae. It therefore has potential as an insecticide for the control of this important global pest.

Key words *Spodoptera frugiperda*; lufenuron; toxicity bioassay; chitin; chitinase

草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), 属鳞翅目 (Lepidoptera) 夜蛾科 (Noctuidae), 是联合国粮农组织全球预警的重大跨境迁飞性害虫, 具有生境地域广、寄主多样、迁飞力强、繁殖速度快、暴食期为害严重、防控治理难度大等特性 (姜玉英等, 2019; 吴益东等, 2019)。自 2019 年 1 月入侵我国, 当年就蔓延到 26 个省 (直辖市、自治区), 目前已完成定殖且周年常态化发生, 严重威胁我国玉米生产 (郭井菲等, 2019; 杨普云等, 2019; 杨亚军等, 2020)。在 2020 年农业农村部公布的一类农作物病虫害名录中, 草地贪夜蛾位居之首。农业农村部先后于 2019 年和 2020 年连续两年推荐的草地贪夜蛾用药名单中无论是单剂还是复配制剂, 虱螨脲均位列其中 (高祖鹏等, 2022)。

虱螨脲 (Lufenuron) 属苯甲酰基脲类昆虫生长调节剂, 是一种低毒的几丁质合成抑制剂, 与传统神经毒剂相比, 具有杀虫机理独特、对非靶标生物安全、不污染环境等优点, 是一种环境友好型的新型杀虫剂 (吴钜文, 2002; 马龙等, 2014)。其主要作用方式为胃毒和触杀, 通过干扰靶标害虫几丁质合成过程, 抑制几丁质合成, 进而使昆虫不能正常脱皮或化蛹而致死, 对鳞翅目幼虫有良好防效 (戴建忠等, 2015; 程东美等, 2019; 贾变桃等, 2019)。几丁质 (Chitin) 是由 N-乙酰氨基葡萄糖聚合成的氨基多糖, 含量仅次于纤维素, 是昆虫表皮、气管及中肠围食膜等结构的重要组成部分 (Merzendorfer, 2011), 起到支撑昆虫身体和保护昆虫免受外界伤害的重要作用; 几丁质酶 (Chitinase, CHT) 是昆虫体内降解几丁质的关键酶, 在昆虫蜕皮和羽化过程中起关键作用 (Merzendorfer and Zimoch, 2003; Arakane and Muthukrishnan, 2010; 李妍等, 2021)。植物和哺乳动物中不含有几丁质, 因而调控其合成途径的关键酶成为新型杀虫剂开发的理想靶标, 在植物保护领域具有很大的应用价

值 (张露等, 2017; 李春春等, 2022)。

由于草地贪夜蛾入侵我国的时间较短, 目前关于虱螨脲防治草地贪夜蛾的研究主要集中在田间防效方面, 已证明虱螨脲对草地贪夜蛾具有较好的防治效果 (程东美等, 2019; 林玉英等, 2020; 陈金翠等, 2022), 但尚未有关于其对草地贪夜蛾致死机理的研究。本研究以草地贪夜蛾幼虫为研究对象, 分析虱螨脲对草地贪夜蛾的室内杀虫活性及其对几丁质含量和几丁质酶活性的影响, 并利用生物信息学对几丁质酶进行系统发育分析, 然后利用 qPCR 测定不同处理后几丁质酶的表达情况, 以期为更好地利用虱螨脲防治草地贪夜蛾提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

草地贪夜蛾采自于安徽省滁州市凤阳县安徽科技学院种植园 (32°52'25"N、117°33'16"E), 幼虫利用人工饲料饲养 (王世英等, 2019), 饲养条件: 温度 (28±1) °C, 湿度 70%-80%, 光照 80%, 光周期 16L: 8D。连续饲养多代后, 选取 3 龄幼虫进行毒力测定等试验。

1.2 主要试剂

98%虱螨脲原药由河南金鹏化工有限公司提供; 牛血清蛋白标准液、考马斯亮蓝 G-250、几丁质酶活性检测试剂盒购自南京检测生物工程研究所; 3-甲基-2-苯并噻唑酮脲盐酸盐水合物 (MBTH)、对二氨基苯甲醛 (DMAB)、N-乙酰氨基葡萄糖均购自上海阿拉丁化学试剂公司; TransScript One-step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒购自北京全式金生物技术股份有限公司, 实时荧光定量 PCR 试剂盒 (TB Green Premix Ex Taq II) 购自宝生物工程股份有限公司。其余所用试剂均为分析纯级。

1.3 虱螨脲杀虫活性测定

根据高祖鹏等(2020)室内生物测定方法,采用表面涂抹法测定虱螨脲对草地贪夜蛾 3 龄幼虫的毒力。根据预实验结果,用含 0.1% Triton X-100 蒸馏水将虱螨脲原药稀释成(4.000、3.000、2.000、1.500、1.250、1.000、0.750、0.625、0.500 和 0.250 mg/L)10 个浓度后备用,以添加 0.1% Triton X-100 蒸馏水作为空白对照。在 24 孔板内每孔放入 1 g 人工饲料,凝固后每孔加入 60 μ L 待测药品。选取生长一致的草地贪夜蛾 3 龄幼虫,饥饿处理 8 h 后,用毛笔将其接入装好饲料的 24 孔板,每孔接入 1 头,每个浓度处理 24 头试虫,重复 3 次。检查统计幼虫存活情况时用毛笔轻触虫体,无任何反应判定为死虫,使用相机对蜕皮困难或畸形个体进行拍照,并计算药剂处理后 48 h 和 96 h 试虫死亡率。

1.4 虱螨脲处理后几丁质含量和几丁质酶活性测定

根据上述生物测定结果,选取 0.5 mg/L (LC_{20}) 和 1.0 mg/L (LC_{50}) 虱螨脲处理草地贪夜蛾 3 龄幼虫,分别于处理 48 h 和 96 h 收集样品用于几丁质含量和几丁质酶活性测定,对照组用 0.1% Triton X-100 蒸馏水处理。每个处理 3 次重复,每次重复 20 头。挑选 0.5 mg/L 虱螨脲处理后存活的草地贪夜蛾幼虫,置于匀浆器内,加入 3 mL 的磷酸二氢钠-柠檬酸缓冲液($pH=6.6$),充分匀浆,10 000 g/min,4 $^{\circ}C$ 离心 10 min,下层沉淀用于几丁质含量测定。取上清再于 15 000 g,4 $^{\circ}C$ 离心 20 min,取上清即为粗酶液,用于几丁质酶活性测定。

几丁质含量测定采用氨基葡萄糖法(Lehmann and White, 1975; Zhang and Zhu, 2006)。几丁质酶活性测定采用 N-乙酰氨基葡萄糖测定法(Imoto and Yagishita, 1971),按照南京建成生物工程研究所几丁质酶测定试剂盒说明书进行活性测定,并以 N-乙酰氨基葡萄糖标准曲线计算几丁质酶活性。根据考马斯亮蓝 G-250 (Coomassie brilliant blue G-250)法,以牛血清白蛋白(BSA)为标准蛋白,测定粗酶液中蛋白

质含量(Bradford, 1976),用于几丁质酶活性的计算。

1.5 几丁质酶基因进化树分析

不同类型的昆虫几丁质酶在生物学功能上存在差异,根据几丁质酶催化区氨基酸序列可以将几丁质酶分为 8 种类型。在草地贪夜蛾转录组数据库中筛选到 5 条假定 *SfChts* 基因,利用在线软件 MAFFT (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>) 将假定 *SfChts* 基因与已报道赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 的几丁质酶基因氨基酸序列进行序列比对,再将比对后的序列用 MEGA5 的邻接法 Neighbor-joining 构建系统发育树,各分支均进行 1 000 次重复检验,并用 FigTree 1.4.3 进一步编辑修饰进化树。

1.6 虱螨脲处理后几丁质酶基因表达量分析

1.6.1 RNA 提取和 cDNA 合成 用 0.5 mg/L 和 1.0 mg/L 虱螨脲处理草地贪夜蛾 3 龄幼虫,对照组草地贪夜蛾用 0.1% Triton X-100 蒸馏水处理,分别于 48 h 和 96 h 后收集样品,进行 I 型和 II 型候选几丁质酶基因的表达情况分析,每个处理设置 3 个重复。样品总 RNA 的提取采用 Trizol 试剂(Invitrogen),具体提取步骤参照试剂说明书。取 10 μ L RNA 样品,利用琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性,并利用 Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific)测定样品 OD260/OD280 值,用于 cDNA 合成的样品 OD260/OD280 值需在 1.8-2.2 之间。按照 TransScript® One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒说明书进行反转录,合成 cDNA,储存于 -20 $^{\circ}C$ 供后续实验使用。

1.6.2 实时荧光定量 PCR 根据转录组数据库中筛选得到的 I 型和 II 型候选几丁质酶基因序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计定量引物,选取草地贪夜蛾 *RPL3* 和 *RPL18* 作为内参基因,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,详见表 1。按照 TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNase H Plus)(Takara, Japan)说明书在 ViiA™ 7 荧光定量 PCR 仪(ABI, 美国)进行荧光定量

PCR 反应。每个反应设置 3 个生物学重复和 3 次技术重复。PCR 反应体系 (20 μ L): cDNA 2 μ L, TB Green® Premix Ex Taq™ II (2 $\times$) 10 μ L, 正反向引物各 0.8 μ L, ROX Reference Dye I (50 $\times$) 0.4 μ L, 无菌水 6 μ L。采用两步法进行反应, 程序如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 3 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s; 40 个循环, 并收集荧光信号。融解曲

线: 60 $^{\circ}$ C 到 95 $^{\circ}$ C 每隔 6 s 收集荧光信号绘制融解曲线, 根据融解曲线判断引物的特异性。

1.6.3 数据统计与分析 采用 SPSS 21.0 软件计算虱螨脲毒力回归方程及 LC_{20} 、 LC_{50} , 相对表达量数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 (Livak and Schmittgen, 2001), 并用 SPSS 21.0 进行 T 检验和单因素方差分析 ($P < 0.05$)。

表 1 草地贪夜蛾 *SfChts* 基因 RT-qPCR 引物列表
Table 1 Primers for real-time PCR of *Cht* genes in *Spodoptera frugiperda*

基因 Gene	上游引物 (5'-3') Primers for sense (5'-3')	下游引物 (5'-3') Primers for anti-sense (5'-3')
<i>SfCht1</i>	GCCGTTCGTTCACTCTGTCA	GTCCCACTTCTTAGTCCATCCTG
<i>SfCht2</i>	ACATACACAGCCTGACATAA	CAAGAACAGCGAATCCATAG
<i>RPL3</i>	CCAAGGGTAAAGGATACAAAGGTG	TCATTACCGTTGCCCCGT
<i>RPL18</i>	GCCAAGACCGTTCTGCTGC	CGCTCGTGTCCTTAGTGC

2 结果与分析

2.1 虱螨脲对草地贪夜蛾幼虫的毒力

采用表面涂抹法测定了不同浓度虱螨脲药剂对供试幼虫的毒力。观察发现, 不同浓度的虱螨脲对草地贪夜蛾幼虫均表现出不同程度的毒性, 且随着处理时间的延长, 毒性表现越明显。0.5 mg/L 虱螨脲处理草地贪夜蛾幼虫 24 h 后, 供试幼虫活动力下降、腹部颜色加深至褐红色, 几乎无死亡; 48 h 后, 试虫中毒症状加深, 幼虫活动迟缓, 不能对刺激做出反应, 最终导致蜕皮困难、头部至中部退皮, 但下半部无法完成蜕皮; 96 h 后, 虱螨脲对草地贪夜蛾幼虫有较好的毒杀作用, 死亡虫体发黑、溢缩、腐烂、起水泡 (图 1: A-D)。

虱螨脲处理 96 h 后的毒力回归方程是 $Y = 2.6X - 0.02$, 相关系数 $R^2 = 0.986$ 。 $LC_{50} = 1.009$ mg/L, 95% 的置信区间为 0.908 - 1.115 mg/L; $LC_{20} = 0.517$ mg/L, 95% 的置信区间为 0.429 - 0.597 mg/L。随着虱螨脲处理浓度增加, 草地贪夜蛾幼虫的死亡率增加, 当虱螨脲浓度达 4.0 mg/L 时, 死亡率达到 99%。

2.2 虱螨脲对草地贪夜蛾几丁质含量的影响

用 0.5 mg/L 和 1.0 mg/L 虱螨脲处理草地贪

夜蛾幼虫 48 h 和 96 h 后, 测定试虫体内几丁质含量。结果表明, 两种剂量虱螨脲处理后的草地贪夜蛾 3 龄幼虫体内几丁质含量均显著低于对照组。处理 48 h 后, 0.5 mg/L 和 1.0 mg/L 虱螨脲处理中几丁质含量分别降为对照组的 8% 和 29%; 而处理 96 h 后, 随着虱螨脲处理浓度的增加试虫体内几丁质含量显著降低, 0.5 mg/L 和 1.0 mg/L 虱螨脲处理中几丁质含量分别降为对照组的 31% 和 6%, 说明虱螨脲可以显著降低草地贪夜蛾幼虫体内几丁质含量 (图 2)。

2.3 虱螨脲对草地贪夜蛾几丁质酶活性的影响

经 0.5 mg/L (LC_{20}) 和 1.0 mg/L (LC_{50}) 的虱螨脲处理草地贪夜蛾幼虫 48 h 和 96 h 后, 试虫体内几丁质酶活性均显著低于对照组 (图 3)。经 LC_{20} 处理 48 h 后, 几丁质酶活性下降为对照组的 9.89%; 经 LC_{20} 和 LC_{50} 处理 96 h 后, 几丁质酶活性分别为对照组的 42.65% 和 72.66%。对照组草地贪夜蛾在处理 48 h 后, 体内几丁质含量较高, 但 96 h 后几丁质含量显著降低, 可能是由于两个时间点试虫处于幼虫蜕皮的不同阶段导致的。

2.4 草地贪夜蛾几丁质酶基因进化树分析

将草地贪夜蛾转录组数据库中查询到的几

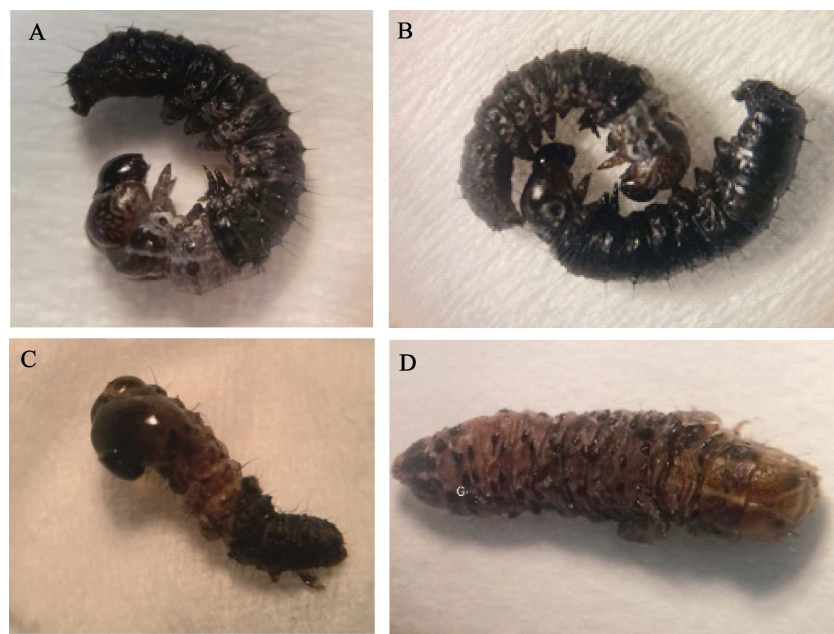


图 1 虱螨脲处理下草地贪夜蛾的中毒症状
Fig. 1 Toxicological symptoms of *Spodoptera frugiperda* treated with lufenuron

A. 蜕皮困难; B. 表皮黑化; C. 腐烂溢出; D. 虫体缢缩。
A. Difficulty in moulting; B. Epidermis melanization; C. Decomposition; D. Body constriction.

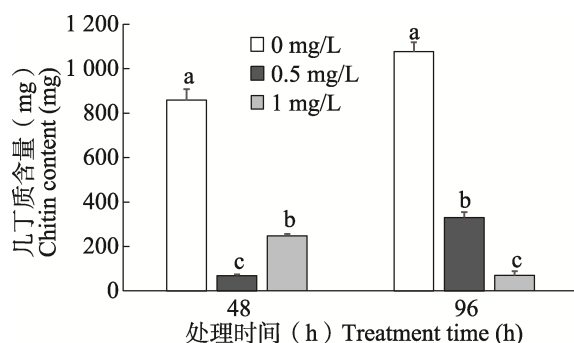


图 2 虱螨脲处理草地贪夜蛾 3 龄幼虫的几丁质含量
Fig. 2 Chitin content in the 3rd instar larvae of *Spodoptera frugiperda* treated with lufenuron

图中误差线为标准差, 柱上标有小写字母表示经 LSD 法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。图 3 及图 5 同。
Error lines in the graph are standard deviations, and histograms with different lowercase letters indicate significant differences at the 0.05 level by LSD test. The same as Fig. 3 and Fig. 5.

丁质酶基因与黑腹果蝇、冈比亚按蚊和赤拟谷盗几丁质酶基因的氨基酸序列进行序列比对并构建系统发育树, 结果显示如图 4, 5 条 *SfChts* 基因聚集在 5 种不同类型的分支上, 且与赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 距离最近。其中, *SfCht1* 与

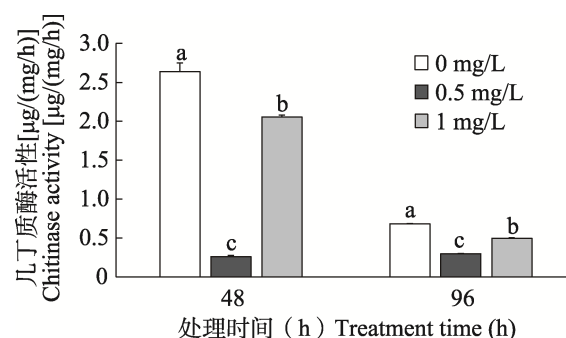


图 3 虱螨脲处理草地贪夜蛾 3 龄幼虫几丁质酶活性
Fig. 3 Chitinase activity in the 3rd instar larvae of *Spodoptera frugiperda* treated with lufenuron

I 型代表几丁质酶基因 *Cht5* 氨基酸序列聚为一支, *SfCht2* 与 II 型代表基因 *Cht10* 聚为一支, *SfCht3*、*SfCht4* 和 *SfCht5* 分别与其他昆虫的 IV 型、V 型和 V II 型聚为一支。

2.5 虱螨脲对草地贪夜蛾几丁质酶基因表达的影响

根据系统发育的分析结果, 采用 RT-qPCR 测定了 I 型 (*SfCht1*) 和 II 型 (*SfCht2*) 基因在虱螨脲处理后草地贪夜蛾幼虫体内的表达量, 结果见图 5 (A, B)。用不同剂量虱螨脲处理草地贪

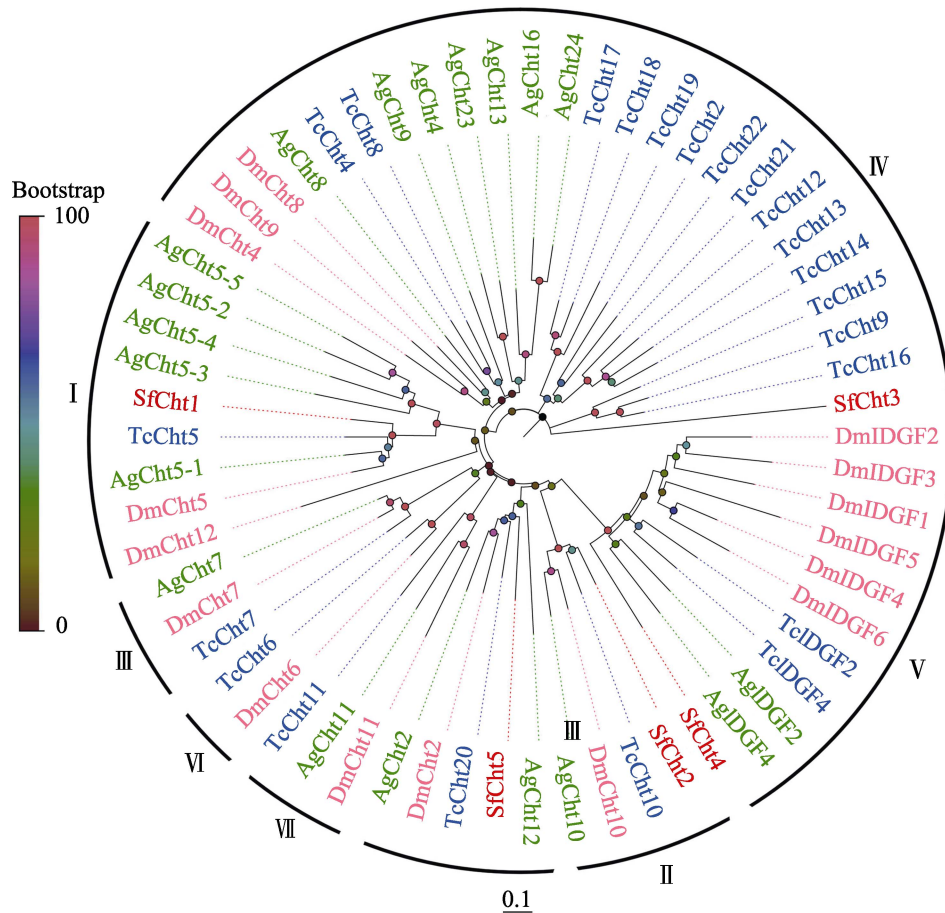


图 4 不同物种 CHI 基因进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of CHI genes in different species

根据氨基酸序列构建系统发育树。Tc: 赤拟谷盗 (蓝色); Dm: 黑腹果蝇 (粉色);

Ag: 冈比亚按蚊 (绿色); Sf: 草地贪夜蛾 (红色)。

Phylogenetic tree constructed from amino acid sequences. Tc: *Tribolium castaneum* (blue); Dm: *Drosophila melanogaster* (pink); Ag: *Anopheles gambiae* (green); Sf: *Spodoptera frugiperda* (red).

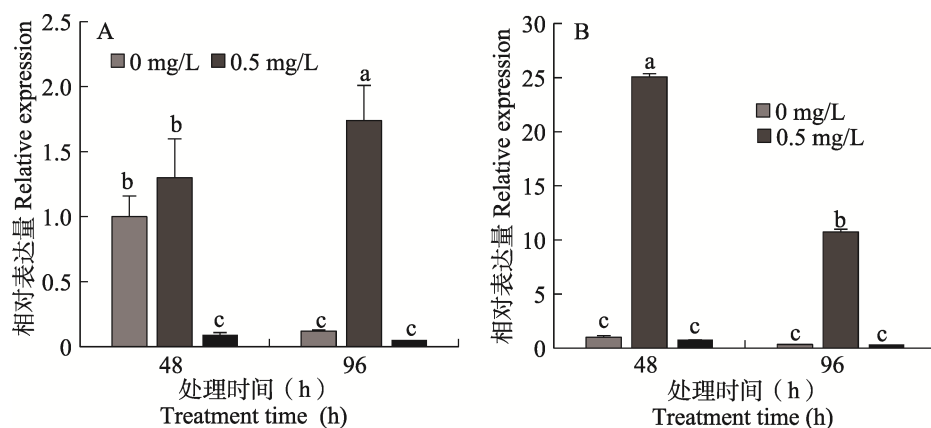


图 5 虱螨脲对草地贪夜蛾 3 龄幼虫几丁质酶基因相对表达量的影响

Fig. 5 Effects of lufenuron on relative expression of chitinase gene in the 3rd instar larvae of *Spodoptera frugiperda*

A. SfCht1; B. SfCht2.

夜蛾幼虫 48 h 和 96 h 后, *SfCht1* 和 *SfCht2* 基因的表达量存在显著差异。与对照相比, 0.5 mg/L (LC_{20}) 处理草地贪夜蛾幼虫后 *SfCht1* 和 *SfCht2* 基因在 48 h 和 96 h 均呈上升趋势, *SfCht1* 的表达水平分别是对照组的 1.3 倍和 8.45 倍, *SfCht2* 的表达水平分别是对照组的 25.07 倍和 30.66 倍。而 1.0 mg/L (LC_{50}) 处理草地贪夜蛾幼虫, *SfCht1* 在 48 h 后与对照相比显著降低, 其他处理与对照相比, 无显著性差异。表明虱螨脲在 LC_{20} 浓度下对几丁质酶基因表达有显著的激活作用, 但 LC_{50} 浓度下对几丁质酶基因的表达有一定的抑制作用。

3 结论与讨论

虱螨脲作为苯甲酰胺类昆虫生长调节剂, 主要通过抑制几丁质合成, 影响昆虫正常的生长发育, 对鳞翅目、半翅目和双翅目昆虫有较强的杀虫活性 (姚永生等, 2009; 杨文文等, 2019)。本研究结果表明, 1.0 mg/L 虱螨脲处理草地贪夜蛾 3 龄幼虫 96 h 后可使致畸死亡率达到 50%, 当虱螨脲浓度达到 4.0 mg/L 时, 草地贪夜蛾幼虫死亡率达到 99%; 程东美等 (2019) 研究发现 2 mg/L 和 5 mg/L 的虱螨脲乳油处理草地贪夜蛾 3 龄幼虫 96 h 后死亡率分别约为 30% 和 70%, 当浓度为 20 mg/L 时, 死亡率达到 98.33%。本研究结果与该研究所得结果类似, 但毒力稍高于其结果, 可能与研究中所用供试药剂、种群代数和种群对虱螨脲的敏感性等因素不同有关。

昆虫生长调节剂的杀虫机制复杂, 其主要通过干扰昆虫表皮几丁质和几丁质酶的合成及代谢来阻碍昆虫正常蜕皮和化蛹, 短时间内能导致昆虫行动迟缓, 但昆虫死亡率低, 一般 96 h 后才会出现较高死亡率 (Hajjar and Casida, 1978; 李慧等, 2016)。本研究发现, 虽然虱螨脲对草地贪夜蛾幼虫有较高的毒性, 但其发挥作用的时间较长, 处理草地贪夜蛾 3 龄幼虫 24 h 后未见明显的中毒现象, 因此本研究选择在药剂处理 48 h 和 96 h 后统计室内毒力及对几丁质和几丁质酶的影响。已有研究表明, 几丁质含量和几丁

质酶活性的变化是阻碍昆虫生长发育的机理所在 (戴芬等, 2000; 台术蕾等, 2020; 张婧瑜, 2021)。例如, 马龙等 (2014) 研究发现氟铃脲能够降低棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 体内几丁质的含量, 影响其正常发育最终畸形死亡; 杨文文等 (2019) 研究发现亚致死浓度 LC_{10} 、 LC_{20} 的氟铃脲和虱螨脲可抑制黑腹果蝇体内几丁质酶的活性。王丹等 (2016) 研究发现姜黄素对朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* 几丁质酶活性也存在抑制作用。本研究结果表明, 虱螨脲可以显著降低草地贪夜蛾幼虫体内几丁质的含量和几丁质酶活性。

不同类型的几丁质酶基因在昆虫体内表现出不同的功能, 在昆虫生长发育期间出现几丁质酶的过量表达或严重缺失, 都会严重影响昆虫的正常生长发育 (Fan *et al.*, 2015)。I 型、II 型、III 型和 IV 型几丁质酶基因主要在幼虫时期表达, 能够影响幼虫蜕皮和化蛹 (李妍等, 2021)。Zhu 等 (2008) 研究发现 RNA 干扰沉默黑腹果蝇几丁质酶基因 *DmCht5* 导致幼虫蜕皮异常, 赤拟谷盗中沉默 *TcCht10* 导致幼虫的蜕皮及化蛹异常。基于进化树分析和基因表达谱分析, 推测分别与 I 型和 II 型代表基因聚为一支的 *SfCht1* 和 *SfCht2* 同样参与几丁质代谢过程。由于几丁质酶在昆虫发育过程中呈现周期性变化的特点, 仅仅在卵-幼虫、幼虫-蛹和蛹-成虫期的蜕皮前短暂时间内表现活性, 且在蜕皮前达到高峰, 在每个龄期第一天和最后一天表达量最低, 龄期中间的第 3 天、第 4 天表达量较高 (苏翠翠, 2017)。本研究中, LC_{20} 浓度下对几丁质酶基因表达显著升高, 但 LC_{50} 浓度下对几丁质酶基因的表达有一定的抑制作用, 说明虱螨脲扰乱草地贪夜蛾体内几丁质酶基因的正常表达, 从而导致草地贪夜蛾幼虫蜕皮困难, 最终蜕皮失败而死亡。

昆虫生长调节剂因其专一性强、毒性低, 对环境友好等特点, 又被称为第四代杀虫剂, 因此开展几丁质酶的研究, 开发以几丁质酶基因为靶标的生物杀虫剂是实现草地贪夜蛾等害虫安全高效防控的绿色途径。该研究为田间科学施用虱螨脲防治草地贪夜蛾提供理论基础, 并通过探索

几丁质酶对昆虫的调控机制, 为害虫绿色防控提供新的策略和思路。

参考文献 (References)

- Arakane Y, Muthukrishnan S, 2010. Insect chitinase and chitinase-like proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(2): 201–216.
- 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.
- Chen JC, Cao LJ, Ma ZZ, Yuan XX, Gong YJ, Shen XJ, Wei SJ, 2022. Susceptibility of different instar larvae of *Spodoptera frugiperda* to commonly used insecticides. *Guangdong Agricultural Sciences*, 49(8): 81–86. [陈金翠, 曹利军, 马中正, 苑新新, 宫亚军, 沈修婧, 魏书军, 2022. 不同龄期草地贪夜蛾对常用杀虫剂的敏感性. 广东农业科学, 49(8): 81–86.]
- Cheng DM, Huang JH, Xu HH, Zhang ZX, 2019. Activity and field effect trials of lufenuron 50% EC against *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Environmental Entomology*, 41(5): 974–978. [程东美, 黄江华, 徐汉虹, 张志祥, 2019. 50 g/L 虱螨脲乳油对草地贪夜蛾的室内活性和田间药效研究. 环境昆虫学报, 41(5): 974–978.]
- Dai F, Wu SG, Wang Q, Zhao XP, Wu CX, 2000. Activity of two groups of insect growth regulators, IGRs to cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2000(6): 363–367. [戴芬, 吴声敢, 王强, 赵学平, 吴长兴, 2000. 苯甲酰基脲类和胍类昆虫生长调节剂对棉铃虫的生物活性. 浙江农业学报, 2000(6): 363–367.]
- Dai JZ, Chen WG, Zhang F, Yang YP, 2015. Evaluation of the toxicity of lufenuron to the silkworm. *Newsletter of Sericulture and Tea*, 2015(2): 1–2. [戴建忠, 陈伟国, 张芬, 杨一平, 2015. 虱螨脲对家蚕的毒性评价. 蚕桑茶叶通讯, 2015(2): 1–2.]
- Fan XJ, Mi YX, Ren H, Zhang C, Li Y, Xian XX, 2015. Cloning and functional expression of a chitinase cDNA from the apple leaf miner moth *Lithocolletis ringoniella*. *Biochemistry Biokhimiia*, 80(2): 242–250.
- Gao ZP, Guo JF, He KL, Wang ZY, 2020. Toxicity of spinetoram and its effects on the detoxifying enzyme and acetyl cholinesterase activities in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Acta Entomologica Sinica*, 63(5): 558–564. [高祖鹏, 郭井非, 何康来, 王振营, 2020. 乙基多杀菌素对草地贪夜蛾幼虫的毒力及对其解毒酶和乙酰胆碱酯酶活性的影响. 昆虫学报, 63(5): 558–564.]
- Gao ZP, Jing DP, Huang XD, Wang ZY, 2022. Cloning of nicotinic acetylcholine receptor subunits $\alpha 6$ and $\alpha 7$ genes in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and their response to spinetoram stress. *Acta Entomologica Sinica*, 65(9): 1098–1105. [高祖鹏, 静大鹏, 黄晓丹, 王振营, 2022. 草地贪夜蛾烟碱型乙酰胆碱受体 $\alpha 6$ 和 $\alpha 7$ 亚基基因克隆及其对乙基多杀菌素胁迫的响应. 昆虫学报, 65(9): 1098–1105.]
- Guo JF, He KL, Wang ZY, 2019. Biological characteristics, trend of fall armyworm *Spodoptera frugiperda*, and the strategy for management of the pest. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 56(3): 361–369. [郭井非, 何康来, 王振营, 2019. 草地贪夜蛾的生物学特性、发展趋势及防控对策. 应用昆虫学报, 56(3): 361–369.]
- Hajjar NP, Casida JE, 1978. Insecticidal benzoylphenyl ureas: Structure-activity relationships as chitin synthesis inhibitors. *Science*, 200(4349): 149–1500.
- Imoto T, Yagishita K, 1971. A simple activity measurement of lysozyme. *Agricultural and Biological Chemistry*, 35: 1154–1156.
- Jia BT, Lu JJ, Yuan JW, Li XC, 2019. Effects of lufenuron on the fecundity and development of the offspring population of diamondback moth *Plutella xylostella* adults. *Journal of Plant Protection*, 46(3): 582–588. [贾变桃, 卢晶晶, 袁嘉伟, 李显春, 2019. 虱螨脲对小菜蛾成虫繁殖力及子代种群发展的影响. 植物保护学报, 46(3): 582–588.]
- Jiang YY, Liu J, Xie MC, Li YH, Yang JJ, Zhang ML, Qiu K, 2019. Observation on law of diffusion damage of *Spodoptera frugiperda* in China in 2019. *Plant Protection*, 45(6): 10–19. [姜玉英, 刘杰, 谢茂昌, 李亚虹, 杨俊杰, 张张丽, 邱坤, 2019. 2019 年我国草地贪夜蛾扩散为害规律观测. 植物保护, 45(6): 10–19.]
- Lehmann PF, White LO, 1975. Chitin assay used to demonstrate renal localization and cortisone-enhanced growth of *Aspergillus fumigatus* mycelium in mice. *Infection & Immunity*, 12(5): 987.
- Li CC, Gou YP, Zhang KX, Zhang QY, Liu CZ, 2022. Summary of research on insect chitinase and its application. *Chinese Journal of Biological Control*, 38(4): 1020–1029. [李春春, 苟玉萍, 张克信, 张强艳, 刘长仲, 2022. 昆虫几丁质酶及其应用研究综述. 中国生物防治学报, 38(4): 1020–1029.]
- Li H, Zhao YH, Wang QH, Liu F, Mu W, 2016. Toxic characters and toxicity of hexaflumuron against *Bradysia odoriphaga* Yang et Zhang (Diptera: Sciaridae) at different developmental stages. *Journal of Plant Protection*, 43(4): 670–676. [李慧, 赵云贺, 王秋红, 刘峰, 慕卫, 2016. 氟铃脲对韭菜迟眼蕈蚊不同虫态的致毒特点及毒力. 植物保护学报, 43(4): 670–676.]
- Li Y, Li JL, Shi XX, Zhang JL, Hu M, 2021. Advances in functional studies, enzymatic properties and applications of insect chitinase. *Science & Technology Vision*, 2021(32): 69–72. [李妍, 李家磊, 师献雪, 张俊丽, 胡森, 2021. 昆虫几丁质酶功能研究、酶学性质及应用研究进展. 科技视界, 2021(32): 69–72.]
- Lin YY, Jin T, Ma GC, Wen HB, Xiang KP, Peng ZQ, Yi KX, 2020.

- Toxicity of 15 insecticides against eggs of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). *Plant Protection*, 46(1): 82–86. [林玉英, 金涛, 马光昌, 温海波, 向凯萍, 彭正强, 易克贤, 2022. 15 种杀虫剂对草地贪夜蛾卵的毒力测定. *植物保护*, 46(1): 82–86.]
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Ma L, Dai W, Zhang CN, 2014. Toxicity of hexaflumuron and its effects on chitin and chitinase of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 42(7): 141–147. [马龙, 戴武, 张春妮, 2014. 氟铃脲对棉铃虫的毒力及几丁质和几丁质酶的影响. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 42(7): 141–147.]
- Merzendorfer H, 2011. The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: Common principles and differences. *European Journal of Cell Biology*, 90 (9): 759–769.
- Merzendorfer H, Zimoch L, 2003. Chitin metabolism in insects: Structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of Experimental Biology*, 206 (24): 4393–4412.
- Su CC, 2017. Analysis of chitinase gene family and chitin concentration in striped rice borer, *Chilo suppressalis*. Master dissertation. Nanjing: Nanjing Agricultural University. [苏翠翠, 2017. 二化螟几丁质酶基因家族及几丁质含量的分析. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学.]
- Tai SL, Ma L, Zhang CN, 2020. Spatio-temporal expression analysis of chitin synthase 1 gene in *Helicoverpa armigera* and its responses to chlorfluazuron. *Journal of Environmental Entomology*, 42(1): 137–146. [台术蕾, 马龙, 张春妮, 2020. 棉铃虫几丁质合成酶 1 基因的时空表达分析及氟啶脲对其表达的影响. *环境昆虫学报*, 42(1): 137–146.]
- Wang D, Zhang BC, Ding W, Zhang YQ, Luo JX, 2016. Effects of curcumin on the expression of chitinase genes from the carmine spider mite, *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval). *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. *农药学报*, 18(2): 165–176.]
- Wang SY, Zhu QD, Tan YT, Ma QL, Wang RF, Zhang MF, Xu HH, Zhang ZX, 2019. Artificial diets and rearing technique of *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) in laboratory. *Journal of Environmental Entomology*, 41(4): 742–747. [王世英, 朱启旋, 谭煜婷, 马千里, 王瑞飞, 张美芳, 徐汉虹, 张志祥, 2019. 草地贪夜蛾室内人工饲料群体饲养技术. *环境昆虫科学*, 41(4): 742–747.]
- Wu JW, 2002. On the Application of insect growth regulators in control of agricultural insect pests. *Agrochemicals*, 2002(4): 6–8. [吴钊文, 2002. 昆虫生长调节剂在农业害虫防治中的应用. *农药*, 2002(4): 6–8.]
- Wu YD, Shen HW, Zhang Z, Wang XL, Shi Y, Wu SW, Yang YH, 2019. Current status of insecticide resistance in *Spodoptera frugiperda* and counter measures to prevent its development, 56(4): 599–604. [吴益东, 沈慧雯, 张正, 王兴亮, 施雨, 武淑文, 杨亦桦, 2019. 草地贪夜蛾抗药性概况及其治理对策. *应用昆虫学报*, 56(4): 599–604.]
- Yang PY, Zhu XM, Guo JF, Wang ZY, 2019. Strategy and advice for managing the fall armyworm in China. *Plant Protection*, 45(4): 1–6. [杨普云, 朱晓明, 郭井菲, 王振营, 2019. 我国草地贪夜蛾的防控对策与建议. *植物保护*, 45(4): 1–6.]
- Yang WW, Gao HH, Zhai YF, Dang HY, Zhao J, Yu Y, 2019. Effects of two insect growth regulators on *Drosophila melanogaster* and *Drosophila suzukii*. *Journal of Plant Protection*, 46(5): 1029–1035. [杨文文, 高欢欢, 翟一凡, 党海燕, 赵静, 于毅, 2019. 两种昆虫生长调节剂对黑腹果蝇和斑翅果蝇的生物活性. *植物保护学报*, 46(5): 1029–1035.]
- Yang YJ, Xu HX, Hu Y, Han HL, Qian JN, Lü ZX, 2020. Growth development and reproduction of *Spodoptera frugiperda* during the seedling stage on different types of maize, 57(6): 1345–1349. [杨亚军, 徐红星, 胡阳, 韩海亮, 钱佳宁, 吕仲贤, 2020. 草地贪夜蛾在不同类型玉米苗期的生长发育与繁殖. *应用昆虫学报*, 57(6): 1345–1349.]
- Yao YS, Xiong RC, Han X, Zhou YF, 2009. Lufenurons' sublethal effect on the growth, development and fecundity of *Helicoverpa armigera*. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 18(4): 66–69. [姚永生, 熊仁次, 韩旭, 周永锋, 2009. 虱螨脲亚致死剂量对棉铃虫生长发育和繁殖力的影响. *西北农业学报*, 18(4): 66–69.]
- Zhang L, Zhu SC, Zheng H, Shen QD, Wang SG, Tang B, 2017. Regulatory function of trehalase genes on chitin metabolism in the cuticle of *Nilaparvata lugens*. *Scientia Agricultura Sinica*, 50(6): 1047–1056. [张露, 朱世城, 郑好, 沈祺达, 王世贵, 唐斌, 2017. 褐飞虱海藻糖酶基因在表皮几丁质代谢中的调控作用. *中国农业科学*, 50(6): 1047–1056.]
- Zhang JY, Han Q, Jiang ZY, Li HL, Deng MF, Zhu K, Li MJ, Duan HX, 2021. Chitinase inhibitors and synthesis and agricultural bioactivity of thiazolidinones: A review. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 23(3): 421–437. [张婧瑜, 韩清, 蒋志洋, 李慧琳, 邓鸣飞, 朱凯, 李明君, 段红霞, 2021. 几丁质酶抑制剂及噻唑烷酮类化合物合成与农用活性研究进展. *农药学报*, 23(3): 421–437.]
- Zhang JZ, Zhu KY, 2006. Characterization of a chitin synthase cDNA and its increased mRNA level associated with decreased chitin synthesis in *Anopheles quadrimaculatus* exposed to diflubenzuron. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(9): 712–725.
- Zhu QS, Arakane Y, Beeman RW, Kramer KJ, Muthukrishnan S, 2008. Characterization of recombinant chitinase-like proteins of *Drosophila melanogaster* and *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(4): 467–477.