

甜菜夜蛾对氯氟氰菊酯抗性的表皮穿透机理

刘永杰^{1, 2}, 沈晋良^{1*}

(1. 南京农业大学植物保护学院农药科学系, 农业部农业病虫监测与治理重点开放实验室, 南京 210095;

2. 山东农业大学植物保护学院, 山东泰安 271018)

摘要: 用三种方法测定了采自南京江浦的甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 对氯氟氰菊酯的抗性。结果表明, 抗性水平的次序为 3 龄幼虫点滴法 (5 499.5 倍) 和 5 龄幼虫点滴法 (3 973.2 倍) > 3 龄幼虫浸叶法 (1 041.6 倍) > 5 龄幼虫叶片夹毒法 (24.7 倍), 因此该品系触杀毒力的抗性水平至少为胃毒毒力 LD₅₀ 的 160 倍。用¹⁴C 标记氯氟氰菊酯测定甜菜夜蛾抗性和敏感品系 5 龄幼虫表皮穿透率结果表明, 处理后 8 h, 抗性品系 5 龄幼虫的表皮穿透率仅为敏感品系幼虫表皮穿透率的 55.5%。证实表皮穿透率的降低是产生抗性的一个重要机理。

关键词: 甜菜夜蛾; 抗药性; 氯氟氰菊酯; 表皮穿透率

中图分类号: Q965.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296 (2003) 03-0288-04

Cuticular penetration mechanism of resistance to *lambda*-cyhalothrin in *Spodoptera exigua* (Hübner)

LIU Yong-Jie^{1, 2}, SHEN Jin-Liang^{1*} (1. Key Laboratory of Monitoring and Management of Plant Diseases and Insects, Ministry of Agriculture, Department of Pesticide Science, College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China)

Abstract: Resistance to *lambda*-cyhalothrin in the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner), collected from Jiangpu County, Nanjing, Jiangsu Province was determined by three bioassay methods. The results indicate that the sequence of resistance levels was topical application for 3rd instar larvae (5 499.5-fold) and 5th instar larvae (3 973.2-fold) > leaf-dip method for 3rd instar larvae (1 041.6-fold) > leaf-sandwich method for 5th instar larvae (24.7-fold). Therefore, the resistant strain of *S. exigua* has a resistance level obtained by way of contact toxicity at least 160 times than that of stomach toxicity. After 8 h treatment the results indicate that the rate of cuticular penetration of ¹⁴C-*lambda*-cyhalothrin in 5th instar larvae of the resistant strain was only about 55.5% of that in the susceptible strain. It is safe to say that delayed cuticular penetration is an important mechanism responsible for this resistance.

Key words: *Spodoptera exigua*; insecticide resistance; *lambda*-cyhalothrin; cuticular penetration

甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (Hübner) 是一种世界性分布的多食性重要农业害虫。自 20 世纪 80 年代中后期以来, 该虫在我国发生危害地区不断扩大, 危害程度也日趋严重。特别是近年来甜菜夜蛾不仅连续多年在我国南方地区和长江流域暴发危害, 而且北方地区也常遭受其严重危害 (江幸福等, 2001)。造成甜菜夜蛾大发生的原因涉及到气候条件、作物种植结构、天敌因子的变化及该虫自

身生物学特性等诸多方面, 但其抗药性的发展是其中一个重要原因 (江幸福和罗礼智, 1999; 刘永杰和沈晋良, 2002)。长期大量使用化学农药防治导致该虫对包括有机氯、有机磷、氨基甲酸酯、拟除虫菊酯、苯甲酰脲及多杀菌素等在内的多类杀虫剂产生了不同程度的抗药性 (Moulton *et al.*, 2000)。

目前我国防治甜菜夜蛾仍以化学药剂为主, 生产上用拟除虫菊酯类杀虫剂防治甜菜夜蛾效果普遍

基金项目: 国家“十五”攻关资助项目 (2001BA509B08); 江苏省“十五”重点攻关项目 (BE2001354)

作者简介: 刘永杰, 男, 1963 年 6 月生, 博士, 副教授, 从事害虫抗药性及杀虫剂毒理研究, E-mail: lyj630619@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: shenjil@public1.ppt.js.cn

收稿日期 Received: 2002-03-05; 接受日期 Accepted: 2003-02-10

较差,基本上不能控制其发生危害,这类药剂主要为触杀作用,因此,药剂能否穿透表皮对其毒力的发挥有很大影响。表皮穿透率降低作为昆虫对杀虫剂产生抗性的一种机理已在家蝇 (Forgash *et al.*, 1962)、烟芽夜蛾 (Vinson and Law, 1971; De Vries and Georghiou, 1981)、小菜蛾 (Noppun *et al.*, 1989) 及棉铃虫 (Ahmad and McCaffery, 1991; Gunning *et al.*, 1991; 吴益东等, 1995) 等多种昆虫中得到证实。国外研究发现甜菜夜蛾对溴氰菊酯的抗性是由于表皮穿透率降低和酯酶活性提高引起的 (Delorme and Fournier, 1988)。为进一步探讨我国甜菜夜蛾对这类药剂毒力下降的原因,我们进行了甜菜夜蛾对氯氟氰菊酯抗性的表皮渗透机理研究。

1 材料与方 法

1.1 供试甜菜夜蛾

敏感品系:由武汉科诺生物技术有限公司提供,在室内未接触任何药剂连续饲养多年,对各类常用杀虫剂敏感。抗性品系:2001年9月采自南京市江浦区大禹集团公司园艺场甜菜田的4、5龄幼虫,对氯氟氰菊酯属高水平抗性。在室内人工饲料饲养,用氯氟氰菊酯药液点滴法处理3龄幼虫,汰选2代后供实验用。

1.2 供试药剂

97.0%氯氟氰菊酯原药和2.5%氯氟氰菊酯乳油,南京红太阳集团公司第一农药厂提供; ^{14}C 标记氯氟氰菊酯,放射性活度为2.550 GBq/mmol,由英国卜内门 (ICI) 公司提供。

1.3 抗药性测定方法

1.3.1 点滴法:原药用丙酮稀释成6~8个系列浓度,用毛细管微量点滴器(容积为0.048 μL 或0.466 μL)分别将药液点滴于3龄(体重为5~7 mg/头)或5龄(100~120 mg/头)幼虫胸部背面。每处理10头,重复3次,每浓度共处理30头,以丙酮作对照。每塑料培养皿放处理幼虫5头(3龄)或1头(5龄),喂以人工饲料,放入 $27 \pm 1^\circ\text{C}$,光周期为14L:10D的光照培养箱内,48 h检查结果。用本实验室建立的BA生物测计数据处理与管理系 统计算毒力回归式、 LD_{50} 值及95%置信限。

1.3.2 浸叶法:供试2.5%氯氟氰菊酯乳油用自来水稀释成6~8个系列浓度,将盆栽夏光甘蓝叶片放入药液中浸渍10 s,晾干后叶柄用脱脂棉浸水包

扎保湿,以自来水浸渍叶片为对照。每个塑料杯内放入1张上述叶片,接入1头3龄幼虫(体重同上),用保鲜膜封口。每处理10头,重复3次,每浓度共处理30头。48 h检查结果。饲养条件和数据统计计算方法同上。

1.3.3 叶片夹毒法:用直径为6 mm的打孔器将盆栽甘蓝叶片打成小圆片,用微量点滴器(0.466 μL)将配成系列浓度的药液点滴到小圆叶片上,待丙酮挥发后再将另一张涂上淀粉浆糊的小圆片与之粘合,成为夹毒叶片。对照圆叶片只点滴丙酮。每个指形管加入1%琼脂2 mL(保湿作用),待凝固后加1片夹毒圆叶,再接入1头饥饿4 h的5龄幼虫(体重同上),用棉塞塞紧管口。每浓度处理30头幼虫,重复3次。凡在24 h内取食完夹毒叶片的再加入无毒叶片继续饲养,未取食完的去掉,处理后48 h检查死虫数量。饲养条件和数据统计计算方法同上。

1.4 表皮渗透率测定方法

1.4.1 试剂及处理液组成:2,5-二苯基恶唑(PPO)、1,4-双(5-苯基-2-恶唑)苯(POPOP)、二甲苯、Triton X-100、高氯酸、双氧水、正己烷均为分析纯;消化液由高氯酸和双氧水以2:1(V/V)混合组成;乳化闪烁液组成为PPO、POPOP、Triton X-100及二甲苯分别为7.5 g、0.3 g、500 mL及1 000 mL。

1.4.2 测定方法:用丙酮配制一定浓度的 ^{14}C 氯氟氰菊酯药液,用毛细管微量点滴器(0.466 μL)将药液点滴于体重为100~120 mg的5龄幼虫胸部背面,每品系至少处理150头以上,处理后置于正常条件下单头饲养。分别于处理后0.5、1、2、4、6和8 h取样,每次从每个品系中各取出10头活虫,用正己烷淋洗试虫体表,每次1 mL,共6次。将幼虫的淋洗液收集于闪烁瓶内,在自然条件下阴干后,加入5 mL乳化闪烁液待测。将淋洗过的幼虫直接放入闪烁瓶中,加入0.5 mL消化液,置于80 $^\circ\text{C}$ 恒温水浴锅中消化至无色透明为止。然后加入5 mL乳化闪烁液待测。

用Backman公司生产的LSC-9800液体闪烁仪测定幼虫体表残留和进入体内的 ^{14}C 氯氟氰菊酯的放射性强度(dpm),并根据公式 $A = [B / (B + C)] \times 100\%$ 计算出不同时间的 ^{14}C 氯氟氰菊酯对5龄幼虫的表皮穿透率(即体内百分含量)。其中:A为表皮穿透率,B为体内的 ^{14}C 氯氟氰菊酯的放射性强度(dpm),C为体表残留的 ^{14}C 氯氟氰菊酯

的放射性强度 (dpm)。

2 结果与分析

2.1 触杀作用与胃毒作用对甜菜夜蛾抗性水平的影响

以武汉敏感品系的毒力资料为相对敏感基线, 采用点滴法 (触杀作用)、浸叶法 (胃毒和触杀作用)、叶片夹毒法 (胃毒作用) 分别测定了采自南京江浦甜菜夜蛾抗性品系的 3 龄或 5 龄幼虫对氯氟氰菊酯的抗性。结果表明: 抗性水平的次序为 3 龄幼虫点滴法 (抗性倍数为 5 499.5 倍) > 5 龄幼虫点滴法 (3 973.2 倍) > 3 龄幼虫浸叶法 (1 041.6 倍) > 5 龄幼虫叶片夹毒法 (24.7 倍); 点滴法、浸叶法及叶片夹毒法间抗性倍数之比依次为 222.7 : 160.9 : 42.2 : 1 (表 1)。上述结果进一步说明, 经穿透昆虫表皮的触杀毒力所引起的抗性高于经口器

和表皮进入的胃毒毒力和触杀毒力之和所引起的抗性, 更明显高于经口器进入的胃毒毒力所引起的抗性。即可以看出甜菜夜蛾幼虫表皮对氯氟氰菊酯穿透率的影响可能是其产生抗性的重要原因之一。

2.2 表皮穿透率

用¹⁴C 标记氯氟氰菊酯测定甜菜夜蛾抗性和敏感品系 5 龄幼虫表皮穿透率动态结果表明: 从整个穿透过程看, 处理后 1 h, 虽然抗性品系的表皮穿透率略高于敏感品系, 但两者差异不显著; 处理后 2 h, ¹⁴C 标记氯氟氰菊酯在两品系间的表皮穿透率存在明显差异, 抗性品系的穿透率稍慢于敏感品系的穿透率; 处理后 8 h, 抗性品系的穿透率 (22.1%) 明显慢于敏感品系的穿透率 (39.8%), 氯氟氰菊酯对抗性品系 5 龄幼虫的表皮穿透率仅为敏感品系幼虫穿透率的 55.5% (表 2)。上述结果证实幼虫表皮穿透率的降低是甜菜夜蛾对氯氟氰菊酯产生抗性的重要原因之一。

表 1 三种测定方法比较甜菜夜蛾对氯氟氰菊酯的抗性水平

Table 1 Comparison of resistance levels of *S. exigua* larvae to *lambda*-cyhalothrin by three assay methods

测定方法 Methods	龄期 Instar	品系 Strains	斜率 <i>b</i> Slope	LD ₅₀ (95% FL) (μg/头) LD ₅₀ (95% FL) (μg/larva)	抗性倍数 RR	抗性倍数之比 Ratio of RR
点滴法 topical application	3 龄 3rd instar	敏感品系 S	2.2864	0.0002 (0.0002 ~ 0.0003)	1	222.7
		抗性品系 R	2.0471	1.0999 (0.8213 ~ 1.4844)	5 499.5	
	5 龄 5th instar	敏感品系 S	2.0787	0.0022 (0.0013 ~ 0.0030)	1	160.9
		抗性品系 R	2.2929	8.7410 (6.5564 ~ 11.2856)	3 973.2	
浸叶法 leaf-dipping	3 龄 3rd instar	敏感品系 S	2.6130	0.1924 (0.1458 ~ 0.2421)	1	42.2
		抗性品系 R	2.3432	200.4 (159.30 ~ 254.97)	1 041.6	
叶片夹毒法 leaf-sandwich	5 龄 5th instar	敏感品系 S	2.4097	0.0208 (0.0111 ~ 0.0297)	1	1
		抗性品系 R	1.1969	0.5139 (0.0618 ~ 1.2169)	24.7	

S: susceptible strain; R: resistant strain; RR: resistance ratio. The same for Table 2

表 2 ¹⁴C 氯氟氰菊酯不同时间在甜菜夜蛾 5 龄幼虫体内相对百分含量 (%)

Table 2 Dynamic of relative percentage of ¹⁴C-*lambda*-cyhalothrin penetrated into the 5th instar larvae body of *S. exigua*

品系 Strains	不同时间体内 ¹⁴ C 标记氯氟氰菊酯相对百分含量 (%) % of ¹⁴ C- <i>lambda</i> -cyhalothrin penetrated into the 5th instar larvae body in different time after treatment						抗性品系穿透率/敏感品系穿透率 Ratio of % of two strains
	0.5 h	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h	
敏感品系 S	4.5	6.8	13.2	16.4	23.6	39.8	55.5
抗性品系 R	4.8	7.3	8.5	10.7	18.6	22.1	

3 讨论

昆虫对杀虫剂产生抗性的机理通常包括表皮穿

透率降低、靶标部位敏感性下降及代谢酶解毒作用增强等方面。20 世纪 60 年代初, Forgash 等 (1962) 首先发现家蝇表皮的穿透性与其抗药性有关, 二嗪农在一个多抗性家蝇品系的表皮穿透率与

敏感品系相比明显降低, 目前已在多种卫生和农业害虫上得以证实。一般认为表皮渗透率降低是杀虫剂穿过表皮的速率降低, 能够延缓杀虫剂到达靶标部位的时间, 使得抗性昆虫具有更多的时间降解杀虫剂, 以减少到达作用部位的药剂量。单纯表皮渗透率降低一般不能引起高水平的抗性, 但当它与其它抗性机制, 如解毒代谢因子、靶标不敏感性等结合起来时, 就可能表现出较高水平的抗性, 在昆虫抗性中对其它抗性因子起强化作用 (Delorme and Fournier, 1988; 沈晋良和吴益东, 1995)。从本研究不同测定方法的结果可看出, 用胃毒法测定抗性品系幼虫的抗性仅为 24.7 倍, 而浸叶法测定的抗性倍数是胃毒法的 42.2 倍, 点滴法测定的抗性倍数是胃毒法的 160.9 ~ 222.7 倍, 说明甜菜夜蛾表皮渗透率影响其在抗性中的作用。至于其代谢酶解毒作用和神经靶标部位敏感性的变化在抗性中的作用还有待进一步的研究。在甜菜夜蛾的抗性治理中若要提高如氯氟氰菊酯等以触杀作用为主的杀虫剂的防治效果, 必须设法提高其对甜菜夜蛾幼虫表皮的渗透率, 也可选用胃毒作用的药剂以避免表皮渗透作用对药效的影响。

参 考 文 献 (References)

- Ahmad M, McCaffery A R, 1991. Elucidation of detoxification mechanisms involved in resistance to insecticides in the third instar larvae of a field-selected strain of *Helicoverpa armigera* with the use of synergists. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 41: 41 - 52.
- Delorme R, Fournier D, 1988. Esterase metabolism and reduced penetration are cause of resistance to deltamethrin in *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuoidea). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 32: 240 - 246.
- De Vries D H, Georghiou G P, 1981. Absence of enhanced detoxification of permethrin in pyrethroid-resistance house flies. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 15: 234 - 241.
- Forgash A J, Cook B J, Riley R C, 1962. Mechanisms of resistance in diazinon-selected multi-resistant *Musca domestica*. *J. Econ. Entomol.*, 60: 1 241 - 1 247.
- Gunning R V, Easton C S, Balfe M E, 1991. Pyrethroid resistance mechanisms in Australian *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pesticide Science*, 33: 473 - 490.
- Jiang X F, Luo L Z, 1999. The outbreak and management of *Spodoptera exigua*. *Plant Protection*, 25 (3): 32 - 34. [江幸福, 罗礼智, 1999. 甜菜夜蛾暴发原因及防治对策. 植物保护, 25 (3): 32 - 34]
- Jiang X F, Luo L Z, Li K B, Zhao T C, Hu Y, 2001. A study on the cold hardiness of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Acta Ecologica Sinica*, 21 (10): 1 575 - 1 582. [江幸福, 罗礼智, 李克斌, 赵廷昌, 胡毅, 2001. 甜菜夜蛾抗寒与越冬能力研究. 生态学报, 21 (10): 1 575 - 1 582]
- Liu Y J, Shen J L, 2002. Monitoring for four group of insecticide resistance in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Cotton Science*, 14 (6): 356 - 360. [刘永杰, 沈晋良, 2002. 甜菜夜蛾对四类杀虫剂的抗药性监测. 棉花学报, 14 (6): 356 - 360]
- Moulton J K, Pepper D A, Dennehy T J, 2000. Beet armyworm (*Spodoptera exigua*) resistance to spinosad. *Pest Management Science*, 56: 842 - 848.
- Noppun V, Saito T, Miyata T, 1989. Cuticular penetration of S-fenvalerate in fenvalerate-resistance and susceptible strains of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 33: 83 - 87.
- Shen J L, Wu Y D, 1995. Insecticide Resistance and Resistant Management in *Helicoverpa armigera*. Beijing: China Agricultural Press. 189 - 190. [沈晋良, 吴益东, 1995. 棉铃虫抗药性及其治理. 北京: 中国农业出版社. 189 - 190]
- Vinson S B, Law P K, 1971. Cuticular composition and DDT resistance in the tobacco budworm. *J. Econ. Entomol.*, 64: 1 387.
- Wu Y D, Shen J L, Tan F J, You Z P, 1995. Mechanism of fenvalerate resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner). *J. Nanjing Agric. Univ.*, 18 (2): 63 - 68. [吴益东, 沈晋良, 谭福杰, 尤子平, 1995. 棉铃虫对氰戊菊酯抗性机理研究. 南京农业大学学报, 18 (2): 63 - 68]