

· 研究简报 ·

棉铃虫对甲氧虫酰肼抗性机理的初步研究

刘娟, 董利霞, 谭晓伟, 范贤林, 芮昌辉*

(中国农业科学院植物保护研究所/农业部农药化学与应用重点开放实验室,北京 100193)

摘要:在室内通过抗性汰选和敏感性反汰选,获得了对甲氧虫酰肼抗性指数相差为72.61倍的棉铃虫 *Helicoverpa armigera*(Hübner) 抗性种群和敏感种群。通过增效试验和离体酶活性测定表明:棉铃虫对甲氧虫酰肼产生的抗药性主要与其多功能氧化酶(MFO)、全酯酶和谷胱甘肽-S-转移酶(GSTs)活性的提高有关。

关键词:棉铃虫;甲氧虫酰肼;抗药性汰选;抗药性机理

DOI:10.3969/j.issn.1008-7303.2011.01.15

中图分类号:S481.4 文献标志码:A 文章编号:1008-7303(2011)01-0087-04

Preliminary study on mechanism of resistance to methoxyfenozide in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner)

LIU Juan, DONG Li-xia, TAN Xiao-wei, FAN Xian-lin, RUI Chang-hui*

(Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Pesticide Chemistry & Application, Ministry of Agriculture, Beijing 100193, China)

Abstract: A methoxyfenozide-resistant population and a homologous susceptible population of *Helicoverpa armigera*(Hübner) were selected in the laboratory. The resistant population showed 72.61-fold resistance to methoxyfenozide compared with susceptible one. Resistant mechanisms of *H. armigera* to methoxyfenozide were preliminary studied by synergism assay using piperonyl butoxide, phosphate defoliant and diethyl maleate *in vivo*, and by enzyme activity assay for mixed function oxidases, general esterases, and glutathione-S-transferases *in vitro*. The results showed that enhancement of activity of the three enzymes may contribute to methoxyfenozide resistance in the resistant population of *H. armigera*.

Key words: *Helicoverpa armigera*; methoxyfenozide; resistance selection; resistance mechanism

棉铃虫 *Helicoverpa armigera*(Hübner) 是一种世界性分布的重要农业害虫。近年来由于过多依赖化学防治,其对多种药剂均已产生不同程度的抗药性^[1]。甲氧虫酰肼(methoxyfenozide)是罗姆哈斯公司研究开发的双酰肼拟脱皮激素类杀虫剂,其作用机理新颖、选择性好、对环境安全,尤其对鳞翅目类害虫具有显著的防治效果,是害虫综合防治的优

选药剂^[2]。

明确害虫对药剂的抗性机理,是制订抗性治理策略的基础。有关棉铃虫对甲氧虫酰肼的抗药性机理,国内外均未见报道。笔者在室内用甲氧虫酰肼对棉铃虫进行抗药性汰选和敏感性反汰选,通过增效试验和代谢酶的活性测定,探讨了棉铃虫对甲氧虫酰肼可能的抗性机理。

收稿日期:2010-04-06;修回日期:2010-05-11.

作者简介:刘娟(1984-),女,重庆南川人,硕士研究生,E-mail:liujuan4111@163.com;* 通讯作者(Author for correspondence):芮昌辉(1964-),男,湖南永州人,研究员,主要从事农业害虫抗药性和植物保护技术研究,电话:010-62815944,E-mail:chru@ippcaas.cn

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划(2006BAD08A03).

1 材料与方法

1.1 供试药剂和试剂

98.2% 甲氧虫酰肼 (methoxyfenozide) 原药, 美国陶氏益农公司; 95% 增效醚 (piperonyl butoxide, PBO)、98% 脱叶磷 (phosphate defoliant, DEF) 和 98% 顺丁烯二酸二乙酯 (diethyl maleate, DEM), 北京恒业中远化工有限公司产品; 磷酸二氢钠、盐酸、乙醚、牛血清蛋白和磷酸氢二钠, 北京广达恒益有限公司产品; 乙二胺四乙酸钠 (EDTA), 北京化工厂产品; 苯甲基磺酰氟 (PMSF)、还原型辅酶 II (NADPH II)、醋酸- α -萘酯 (α -naphthyl acetate, α -NA) 和二硫代苏糖醇 (DTT), 北京耀北生物技术有限公司产品; 对硝基苯甲醚, 美国 Sigma 公司产品; 考马斯亮蓝和固蓝 B 盐, 上海化学试剂采购供应站; 对硝基苯酚, 北京西中化工厂产品; 1-氯-2,4-二硝基苯 (CDNB), 中国医药公司北京分公司产品; 还原型谷胱甘肽 (GSH), 东风生化技术公司产品; α -萘酚, 北京精细化工厂生产; 十二烷基硫酸钠, 华美生物工程公司产品。

1.2 供试虫源

棉铃虫 *H. armigera* 成虫于 2005 年采自河北省冀州市棉田, 经室内筛选获得抗性种群和敏感种群。参照范贤林等的方法^[3]饲养。

1.3 试验方法

1.3.1 抗性种群的选育和毒力测定 群体汰选方

$$\text{增效比}(SR) = \text{杀虫剂单用的 } LC_{50} \text{ 值} / (\text{杀虫剂} + \text{增效剂}) \text{ 的 } LC_{50} \text{ 值} \quad (1)$$

1.3.4 多功能氧化酶 (MFO) 活性测定 将抗性种群和敏感种群棉铃虫 6 龄 2 日龄幼虫于冰上解剖, 取出中肠, 去除内含物, 用冰冷的 0.1 mol/L (pH = 7.8) 的磷酸缓冲液洗净。5 头中肠作为一个处理, 加入 1 200 μ L/L 的磷酸缓冲液 (含 1 mmol/L 的 EDTA、1 mmol/L 的 DTT、0.4 mmol/L 的 PMSF 和质量分数为 20% 的甘油), 冰水浴中匀浆, 1.2×10^4 r/min、4 $^{\circ}$ C 下离心 40 min, 取上清液再次离心 20 min, 以上清液作酶源, 于 -20 $^{\circ}$ C 下保存备用。

MFO 的测定方法参照 Hansen 和 Hodgson 的方法^[8]。测定体系含酶液 1 mL、NADPH II 2.5 mg、对硝基苯甲醚 10 μ L 和 0.1 mol/L (pH = 7.8) 的缓冲液 1 mL, 于 28 $^{\circ}$ C 恒温水浴中振摇 30 min 后, 加入 1 mol/L 的盐酸 1 mL 终止反应。先用 5 mL 乙醚萃取, 再用 0.5 mol/L 的氢氧化钠水溶液 (3.0 mL) 萃取。测定氢氧化钠溶液层在波长 400 nm 下的吸

法参照文献[4]进行。单对汰选: 在卢美光等的方法^[5]上略有改变。将 20 对棉铃虫雌雄蛾单对交配, 将交配成功的后代隔离成一系列株系。从每个株系中随机挑出 30 ~ 50 头 2 龄幼虫, 用甲氧虫酰肼以适当的剂量处理, 根据测定结果选出死亡率最低的 2 ~ 3 个株系, 将其与未测定的部分混合留种, 供下一代筛选用。在抗性种群的选育过程中, 每隔 2 ~ 5 代采用饲料混合法^[6]进行一次毒力测定。

1.3.2 敏感种群的选育和毒力测定 采用吴益东等单对反汰选的方法^[7]。将 20 对棉铃虫雌雄蛾单对交配, 将交配成功的后代隔离成一系列株系。从每个株系中随机抽出 30 ~ 50 头 2 龄幼虫用甲氧虫酰肼以区分剂量进行处理, 选出死亡率最高的 2 ~ 3 个株系, 将其对应的未测定部分混合留种, 供下一代筛选用。毒力测定方法同 1.3.1 节。

1.3.3 增效剂 PBO、DEF 和 DEM 对杀虫剂的增效作用 采用增效剂预处理方法, 测定 PBO、DEF 和 DME 在抗性种群中对甲氧虫酰肼的增效作用。将 PBO、DEF 和 DEM 配制成一定浓度的丙酮溶液, 点滴到 2 龄棉铃虫幼虫的前胸背板, 点滴量为 0.5 μ L/头 (在测定浓度范围内均对供试幼虫无直接毒杀作用)。采用饲料混合法^[6], 分别测定药剂单用及药剂与增效剂混用的 LC_{50} 值, 由 (1) 式计算增效比 (SR)。试验时, 参照文献方法, 先用增效剂处理幼虫, 1 h 后再用药剂处理, 进行生物测定。

光度, 以不加 NADPH II 的处理为对照。

1.3.5 酯酶活性测定 取抗性种群和敏感种群棉铃虫 3 龄中期幼虫, 每 5 头为一处理, 加入 500 μ L、0.02 mol/L (pH = 7.5) 的磷酸缓冲液, 在冰水浴中匀浆, 匀浆液在 1×10^4 r/min、4 $^{\circ}$ C 下离心 10 min, 以上清液作为酶源, 于 -20 $^{\circ}$ C 下保存备用。

参照 Han 等的方法^[9]。在试管中加入 3 mol/L 的 α -NA (含 0.000 1 mol/L 的毒扁豆碱) 5 mL, 再加入 1 mL 酶液, 置于 25 $^{\circ}$ C 恒温水浴中振摇 25 min 后, 立即加入 1 mL 显色液 (由质量分数为 1% 的固蓝 B 盐和 5% 的十二烷基硫酸钠溶液以体积比 2:5 的比例混合而成)。稳定 30 min 后, 测定波长 600 nm 下的吸光度。对照以 1 mL、0.02 mol/L 的缓冲液 (pH = 7.5) 代替酶液, 其余处理相同。

1.3.6 谷胱甘肽-S-转移酶 (GSTs) 活性测定 酶液制备方法与 1.3.4 节一致。采用 Booth 等提出的

CDNB法^[10],但略有改变。将900 μL 、0.1 mol/L (pH=7.8)的磷酸缓冲液,100 μL 酶液,1 000 μL 、1.2 mmol/L的CDNB和100 μL 、6 mmol/L的GSH于27 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温振荡30 min后,测定波长340 nm下的吸光度。对照以100 μL 、0.1 mmol/L的磷酸缓冲液(pH=7.8)代替酶液,其余处理相同。

1.3.7 蛋白质含量测定 参照Bradford的方法^[11],用考马斯亮蓝G-250染色,以牛血清白蛋白(BSA)为标准蛋白。采用DPS-V7-05版进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 棉铃虫对甲氧虫酰肼的抗药性选育

2.1.1 抗性种群的选育 在室内,棉铃虫抗性种群共被饲养了35代,用甲氧虫酰肼处理了31代,与起始种群相比,抗性倍数达到30.57倍(见图1)。其中,F0代~F31代采用群体汰选方法,抗性倍数从1.00倍上升到16.95倍;F32代~F35代采用单对汰选方法,抗性倍数从16.95倍上升到30.57倍。在整个汰选期间,抗性的发展具有起始缓慢,继之不稳定,然后转为迅速增长的特点。

2.1.2 敏感种群的选育 在总计饲养的35代中,用甲氧虫酰肼反汰选了4代,其余31代不用任何药剂处理,逐代自然饲养,反汰选结果见表1。LC₅₀值由起始的13.61 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 下降到第4代的5.73 $\mu\text{g}/\text{mL}$,下降了7.88 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。抗性倍数从1.00倍下降到0.42倍,获得了相对敏感种群。

表2 增效剂在棉铃虫抗性种群中对甲氧虫酰肼的增效作用

Table 2 Synergism of synergists to methoxyfenozide in resistant populations of *H. armigera*

药剂+增效剂 Insecticide + synergist	LC ₅₀ 值(95%置信限) (95% Credible limit) / ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	斜率(标准误) Slope ($\pm SE$)	增效比 SR
甲氧虫酰肼 methoxyfenozide	416.07(268.39 ~ 645.01)	1.41 (± 0.18)	—
methoxyfenozide + PBO	150.49(104.61 ~ 216.49)	1.56 (± 0.18)	2.76
methoxyfenozide + DEF	132.27(91.71 ~ 190.76)	1.76 (± 0.20)	3.15
methoxyfenozide + DEM	67.81(37.53 ~ 122.54)	1.24 (± 0.18)	6.14

2.3 3种代谢酶的比活力

为了进一步证实3种解毒酶与棉铃虫对甲氧虫酰肼的抗性关系,对抗性种群和敏感种群的解毒代谢酶的比活力进行了测定。由表3可知,抗性种群MFO、全酯酶和GSTs比活力分别是敏感种群的1.02、1.09和1.38倍($P < 0.01$),表明棉铃虫对甲氧虫酰肼产生抗药性与3种解毒酶的活性增加有关,其中与GSTs关系最密切,这与增效试验的结果

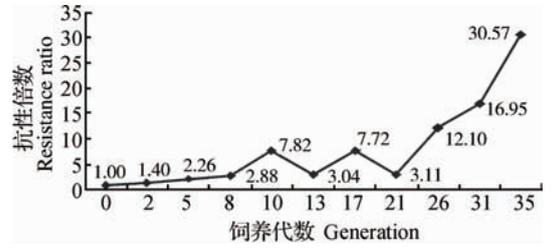


图1 棉铃虫抗性种群对甲氧虫酰肼的抗性发展情况
Fig. 1 Development of resistance to methoxyfenozide in the resistant population of *H. armigera*

表1 敏感种群中甲氧虫酰肼对棉铃虫的反汰选结果
Table 1 Results of anti-selection in susceptible population of *H. armigera* to methoxyfenozide

汰选代数 Selection generation	LC ₅₀ 值(95%置信限) (95% Credible limit) / ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	坡度 Slope	抗性倍数 Resistance ratio
0	13.61(10.15 ~ 18.25)	2.07	1.00
2	21.24(13.81 ~ 32.68)	1.25	1.56
3	14.70(10.43 ~ 20.71)	1.64	1.08
4	5.73(4.10 ~ 8.02)	1.75	0.42

2.2 3种增效剂对甲氧虫酰肼的增效作用

从表2可知,PBO、DEF和DEM对甲氧虫酰肼的增效比值分别是2.76、3.15和6.14倍,表现出明显的增效作用,且增效作用DEM > DEF > PBO,这表明棉铃虫对甲氧虫酰肼产生抗性可能与MFO、酯酶和GSTs有关。

一致。

3 讨论

昆虫对杀虫剂产生抗药性是昆虫的一种进化现象。一种药剂长期、大量不合理使用,害虫极有可能对其产生抗药性。本研究在室内采用甲氧虫酰肼对棉铃虫进行了抗药性选育,LC₅₀值从13.61 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 增加到416.07 $\mu\text{g}/\text{mL}$,获得了30.57倍的抗性种

表 3 棉铃虫抗性种群和敏感种群中 3 种酶的比活力

Table 3 Activities of three enzymes in the resistant and susceptible populations of *H. armigera*

种群 Strain	MFO 比活力 MFO activity/ [nmol <i>p</i> -nitrophenol · (mg Pr) ⁻¹ · min ⁻¹] (Mean ± SE)	全酯酶比活力 General esterases activity/ [nmol 1-naphthol · (mg Pr) ⁻¹ · min ⁻¹] (Mean ± SE)	GSTs 比活力 GSTs activity/ [340 nm · (mg Pr) ⁻¹ · min ⁻¹] (Mean ± SE)
抗性种群 Resistant population	9.323 9 ± 0.03 A *	6.421 3 ± 0.11 A	1.123 9 ± 0.02 A
敏感种群 Susceptible population	9.121 2 ± 0.02 B	5.869 3 ± 0.08 B	0.879 3 ± 0.08 B
比值 Ratio	1.02	1.09	1.38

注：“*”同列数据后不同字母表示差异显著 ($P < 0.01$)。Note: “*” Different superscript letters following data in the column indicate significant difference ($P < 0.01$)。

群。敏感种群经过 4 代的单对反汰选,与起始值相比,LC₅₀值下降到 5.73 μg/mL。通过抗性汰选和敏感性反汰选,获得了对甲氧虫酰肼抗性指数相差为 72.61 倍的棉铃虫抗性种群和敏感种群。Osorio 等^[12]曾用甲氧虫酰肼对由墨西哥田间采集的甜菜夜蛾种群进行室内选育,经过 6 代选育,并未获得抗性种群。Mosallanejad 等^[13]经过 13 代抗性汰选,只获得 5.5 倍的海灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis* 抗性种群。王建军等^[14]经过 9 代抗性选育,获得了对甲氧虫酰肼敏感性下降 3.95 倍的斜纹夜蛾种群。以上研究表明,在室内的选择压力下,不同种类的危害虫对甲氧虫酰肼的抗药性发展速度是比较缓慢的。

甲氧虫酰肼是酰肼拟蜕皮激素类杀虫剂,属于昆虫生长调节剂的一种,由于该药剂作用机理新颖,对环境友好,与同类型药剂相比选择性更好,同时对其他药剂不易产生交互抗性,使得该药剂的使用范围越来越广泛^[13]。明确一种新型药剂的抗性机理,不但有利于延长药剂的使用寿命,而且还能有害虫抗药性治理提供理论依据。本研究通过增效剂预处理的方法,发现 PBO、DEF 和 DEM 3 种增效剂对甲氧虫酰肼均有增效作用。为了进一步获得代谢抗性机理的可靠证据,测定了 MFO、全酯酶和 GSTs 的离体活性,3 种代谢酶在抗性种群和敏感种群中均有显著性的差异,与增效试验结果一致。棉铃虫体内这 3 种代谢酶比活力的提高是其对甲氧虫酰肼产生抗性的主要原因,但是否与表皮穿透速率降低和靶标敏感性下降有关,还有待进一步的研究。

参考文献:

- Entomol, 1998, 43(1): 545 - 569.
- [3] FAN Xian-lin(范贤林), RU Li-jun(茹李军), WEI Cen(魏岑). 一种新型棉铃虫实验盒的设计与应用[J]. *Plant Protection* (植物保护), 1998, 24(4): 41 - 42.
- [4] LIU Juan(刘娟), RUI Chang-hui(芮昌辉), FAN Xian-lin(范贤林), et al. 棉铃虫对甲氧虫酰肼的抗性遗传力[J]. *Acta Phytophylacica Sinica* (植物保护学报), 2009, 36(4): 349 - 353.
- [5] LU Mei-guang(卢美光), FAN Xian-lin(范贤林). 单对汰选方法在加速抗高效氯氟菊酯棉铃虫品系汰选中的应用[J]. *Chin J Pestic Sci* (农药学学报), 2002, 4(2): 89 - 92.
- [6] FAN Xian-lin(范贤林), RUI Chang-hui(芮昌辉). 棉铃虫对甲氧虫酰肼的抗药性汰选[J]. *Plant Protection* (植物保护), 2006, 32(1): 98 - 100.
- [7] WU Yi-dong(吴益东), SHEN Jin-liang(沈晋良). 棉铃虫对氟戊菊酯抗性和敏感品系的选育[J]. *Acta Entomol Sin* (昆虫学报), 1994, 37(2): 129 - 136.
- [8] HANSEN L G, HODGSON E. Biochemical characteristics of insect microsomes (*N*- and *O*-demethylation) [J]. *Biochem Pharmacol*, 1971, 20(7): 1569 - 1578.
- [9] HAN Z J, MOORES G D, DENHOLM I, et al. Association between biochemical markers and insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover [J]. *Pestic Biochem Phys*, 1998, 62(3): 164 - 171.
- [10] BOOTH J, BOYLAND E, SIMS P. An enzyme from rat liver catalysing conjugation with glutathione [J]. *J Biochem*, 1961, 79(3): 516 - 524.
- [11] ELLMAN G L, COURTNEY K, ANDRES V J, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. *Biochem Pharmacol*, 1961, 7: 88 - 95.
- [12] OSORIO A, MARTINEZ A M, SCHNEIDER M I, et al. Monitoring of beet armyworm resistance to spinosad and methoxyfenozide in Mexico [J]. *Pest Manag Sci*, 2008, 64(10): 1001 - 1007.
- [13] MOSALLANEJAD H, SMAGGHE G. Biochemical mechanisms of methoxyfenozide resistance in the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* [J]. *Pest Manag Sci*, 2009, 65(7): 732 - 736.
- [14] WANG Jian-jun(王建军), TIAN Da-jun(田大军), ZHUANG Jing(庄静). 斜纹夜蛾对甲氧虫酰肼的抗性选育及抗性风险评估[J]. *Jiangsu J Agric Sci* (江苏农业学报), 2009, 25(1): 79 - 83.

(责任编辑: 金淑惠)