

亚致死剂量三唑锡对二斑叶螨 *Tetranychus urticus* 解毒酶系的影响

叶调琴, 杨顺义, 李文平

(甘肃农业大学植物保护学院, 甘肃省农作物病虫害生物防治工程实验室, 甘肃 兰州 730070)

摘要:为明确三唑锡对二斑叶螨体内解毒酶系的影响, 在室内采用叶片喷雾法, 以亚致死剂量 LC_{10} (0.159 mg/L) 和 LC_{30} (0.247 mg/L) 三唑锡处理二斑叶螨敏感品系后, 测定不同时间段其体内羧酸酯酶 (CarEs)、谷胱甘肽 S-转移酶 (GSTs) 和多功能氧化酶 (MFOs) 的酶比活性, 为二斑叶螨对三唑锡的抗性机制研究提供科学依据。结果如下: 二斑叶螨用 LC_{10} 和 LC_{30} 剂量的三唑锡处理 3、6、12、24 和 48 h 后, 与对照相比, 其体内 GSTs、CarEs 和 MFOs 酶比活性, 随时间增长, 均不同程度升高且明显高于对照。 LC_{30} 处理组 GSTs 酶比活性明显高于 LC_{10} 处理组, 在 6 和 24 h 时达到最大; LC_{30} 处理组的 CarEs 酶比活性高于 LC_{10} 处理组; LC_{30} 处理组的 MFOs 酶比活性高于 LC_{10} 处理组且 LC_{10} 处理组 CarEs 和 MFOs 酶比活性均在 48 h 时达到最大。3 种解毒酶的酶比活性随三唑锡浓度的增加而升高。

关键词:二斑叶螨; 三唑锡; 亚致死剂量; 解毒酶系

中图分类号:S433.7 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2022)02-0119-05

DOI: 10.13817/j.cnki.cyycp.2022.02.017



二斑叶螨 (*Tetranychus urticae*) 是一种世界性的农牧业害螨, 为害多种作物, 如苜蓿、三叶草等。二斑叶螨的成、若螨群集于植物叶背刺吸汁液, 受害叶片呈白色失绿斑点, 严重时枯死。二斑叶螨有体型小, 繁殖快, 世代短, 分布广和突变率高等特点, 加之不合理的使用化学农药, 使其对多种药剂产生了抗药性, 给现代农业生产造成了严重损失^[1-2]。

在甘肃地区二斑叶螨主要危害果树、蔬菜、农作物及牧草, 且危害范围有扩大的趋势。梁旭东^[3]研究发现兰州市二斑叶螨中度为害。张廷伟等^[4]研究发现二斑叶螨 3 个不同虫口密度下白三叶体内叶绿素含量、POD、PPO 活性差异显著 ($P < 0.05$)。

三唑锡, 化学名称为 1-(三环己基甲锡烷基)-1 氢-

1,2,4-三氮杂茂, 是一种广谱的有机锡类杀螨剂, 广泛用于防治果树、蔬菜和花卉上发生的害螨, 对柑橘红蜘蛛 (*Panonychus citri*)、苹果全爪螨 (*P. ulmi*) 二斑叶螨的防治效果显著, 对抗有机磷农药的螨类有较好的防治效果, 可杀灭若螨及成螨, 对夏卵也有一定杀灭效果^[5-6]。刘敏等^[7]研究发现三唑锡亚致死浓度与土耳其斯坦叶螨 (*T. turkestanii*) 运动速率成反比。安晓宁等^[8]研究发现 20% 三唑锡悬浮剂对苹果红蜘蛛防效好且对苹果树安全。于士将等^[9]研究发现 20% 四螨嗪·三唑锡悬浮剂对柑桔全爪螨 (*P. citri*) 防效较好且对柑桔和天敌安全。

螨类抗药性的形成与其代谢作用及靶标部位的敏感性密切相关。螨类主要通过调节体内谷胱甘肽 S-转移酶 (GSTs)、羧酸酯酶 (CarE) 和多功能氧化酶 (MFOs) 等解毒酶表达量或活性的增加, 来提高对药剂的解毒能力^[10]。目前, 已有大量研究表明叶螨对多种农药产生抗性, 包括神经毒素类 (如有机磷类、氨基甲酸酯类、拟除虫菊酯类)、线粒体电子传递链抑制剂类 (哒螨灵) 等^[11-12]。但三唑锡对叶螨的抗药性研究报道较少。本文研究了三唑锡亚致死剂量

收稿日期: 2021-03-16; 修回日期: 2021-06-15

基金项目: 甘肃农业大学学科建设专项基金 (GAU-XKJS-2018-153)

作者简介: 叶调琴 (1993-), 女, 甘肃临洮人, 硕士研究生。

E-mail: 1400492482@qq.com

杨顺义为通信作者。

E-mail: yangshy@gsau.edu.cn

LC₁₀ 和 LC₃₀ 处理下二斑叶螨体内 3 种解毒酶 (CarEs、GSTs 和 MFOs) 酶比活性的变化情况,旨在为深入研究二斑叶螨的抗药性机制及三唑锡的合理使用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫 二斑叶螨敏感品系由甘肃农业大学植物保护学院农药学实验室提供,在室温(25±1)℃,相对湿度(70±5)%条件下,用新鲜、干净的豇豆叶片饲养,期间不接触任何药剂,连续繁殖,取雌成螨作供试虫源。

1.1.2 供试药剂 20%三唑锡悬浮剂(陕西标正作物科学有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 室内毒力测定及亚致死剂量确立 毒力测定:室内毒力测定参照 FAO(1980)推荐的玻片浸渍法^[16] (slide-dip method)并加以改进。取 1 cm 宽的双面胶带剪成 1.5 cm 长,贴在载玻片的一端,用镊子揭去双面胶上的纸片,再用零号毛笔挑取行动活泼的雌成螨,将其背部粘在双面胶带上(不能粘住螨足、螨须和口器),每片粘 35 头,分成 3 行。在温度(25±1)℃,相对湿度为(70±5)%的智能人工气候箱中放置 1 h 后,用双目镜观察,去除死亡和不活泼个体,保留 30 头。移取 1 mL 20%三唑锡悬浮剂,分别加水稀释为 1、0.66、0.5、0.4、0.33 mg/L 等 5 个浓度,将带螨载玻片一端浸入药液中,轻轻摇动 5 s 后取出,用滤纸吸干螨体周围多余的药液,放入铺有海绵的托盘中,置于温度(25±1)℃、光周期 L:D=16 h:8 h、相对湿度为(70±5)%的智能人工气候箱,24 h 后检查结果,用笔尖轻触螨体,以螨足不动者为死亡;试验重复 3 次,以无菌室作为对照,计算出毒力回归方程,得出 LC₁₀ 与 LC₃₀ 值。

1.2.2 解毒酶系酶液制备 供试螨处理 根据室内毒力测定结果,以 LC₁₀ 和 LC₃₀ 浓度,采用叶片喷雾法处理二斑叶螨雌成螨,每处理设 3 个重复,以无菌水作对照^[14]。喷药后放置于温度为(25±1)℃,相对湿度(70±5)%,光周期 16 h:8 h 的条件下饲养。将喷药后的雌成螨分别于 3、6、12、24、48 h,每个时间段各挑取 100 头活螨置于干净的 1.5 mL 离心管中,放置 4℃冰箱下保存待用。

解毒酶系酶液制备 用零号毛笔分别挑取三唑锡药剂处理 and 无菌水处理后的二斑叶螨雌成螨 100 头,置于 3 个 1.5 mL 离心管中,于 4℃冰箱冰冻 24 h,再分别加入 0.04 mol/L pH 7.0 磷酸缓冲液、66 mmol/L pH 7.0 磷酸缓冲液和 0.1 mol/L pH 7.8 磷酸缓冲液 1.5 mL,用研磨棒于冰水浴中研磨,在 10 000 r/min,4℃下离心 15 min,取上清液备用。

酶源蛋白含量及解毒酶系酶比活性测定:牛血清蛋白、α-萘酚和对硝基苯酚标准曲线制作:参照何恒果^[15]的方法。酶源蛋白含量测定:参考 Bradford^[16]的方法。羧酸酯酶(CarEs)活性测定参考 Van Asperen^[17]方法;谷胱甘肽转移酶(GSTs)活性测定参考 Clark 等^[18]方法;多功能氧化酶(MFOs)活性测定参考 Hansen 和 Hodgson^[19]方法。

1.3 数据处理

运用新复极差法(Duncan's)分析各处理间酶比活力差异显著性。

2 结果与分析

2.1 三唑锡毒力测定结果

三唑锡毒力回归方程为 $y = 3.959x + 1.882$,卡方值 $\chi^2 = 4.589$,相关系数 $R = 0.928$,LC₅₀ 值为 0.335 mg/L,LC₁₀ 值为 0.159 mg/L,LC₃₀ 值为 0.247 mg/L。

2.2 亚致死剂量三唑锡对二斑叶螨解毒酶比活性的影响

2.2.1 亚致死剂量三唑锡对 GSTs 酶比活性的影响

三唑锡亚致死剂量 LC₁₀ 处理二斑叶螨后,其体内的 GSTs 在 3~6 h 和 12~24 h 酶比活性逐渐升高,6 h 达到最高,其余时间段酶比活性下降,整体明显高于对照;LC₃₀ 剂量处理后,变化规律与 LC₁₀ 相似,除 24 h 酶比活性低于 LC₁₀ 外,其余时间段 GSTs 活力缓慢升高,在 6 h 和 48 h 时达到最大,处理 6~12 h 酶比活性下降,12 h 时达到最低,但酶比活性整体高于对照和 LC₁₀ (图 1)。

2.2.2 三唑锡亚致死剂量对 CarEs 酶比活性的影响

二斑叶螨 CarEs 酶比活性在 LC₁₀ 剂量下,总体呈上升趋势,6~12 h 酶比活性降低,其余时间段内均逐渐增加,至 48 h 时达到最大,除 3 h 时低于对照外,其余均高于对照。LC₃₀ 剂量下整体呈上升趋势,12~24 h 酶比活性降低,其余时间段内均逐渐增加,至 48 h 时达到最大,明显高于对照和 LC₁₀ (图 2)。

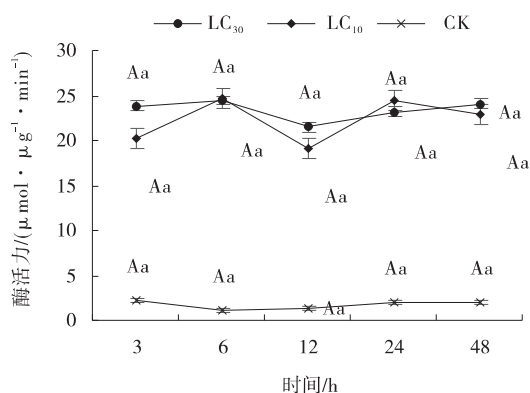


图 1 三唑锡亚致死剂量处理下二斑叶螨体内 GSTs 酶比活性的变化

Fig. 1 The activity of GSTs in *T. urticae* under the treatment of sublethal does concentration of azacyclotin

注:大写字母表示不同时间解毒酶比活性差异极显著($P < 0.01$),小写字母表示不同时间解毒酶比活性差异显著($P < 0.05$),下同

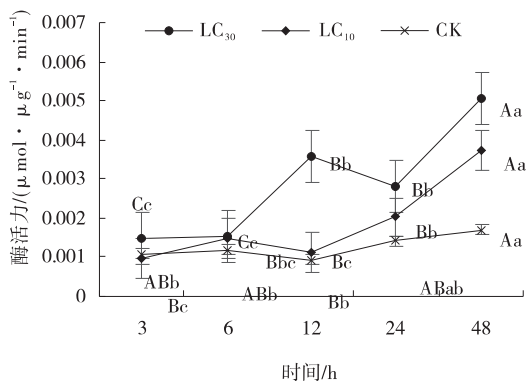


图 2 亚致死剂量三唑锡处理下二斑叶螨体内 CarEs 酶比活性

Fig. 2 The activity of CarEs in *T. urticae* under the treatment of sublethal does concentration of azacyclotin

2.2.3 三唑锡亚致死剂量对 MFOs 比活力的影响

二斑叶螨 MFOs 活力在 LC_{10} 剂量下总体呈缓慢上升趋势,在 6~12 h 和 24~48 h 升高,至 48 h 时达最大,除 3 和 24 h 时低于对照外,其余时间段内均高于对照;在 LC_{30} 剂量下整体呈下降趋势,其中在 3~6 h 时上升较快,而后下降,在 6 h 时达到最大,除 48 h 时外,其余时间酶活均高于 LC_{10} ,且各时间点间差异不显著。

3 讨论

化学药剂杀虫是防治害虫的最普遍的措施。杀虫剂除了直接杀灭害虫外,残存于环境中的有效成分也会随着时间的推移降解至亚致死浓度,引起亚致死效

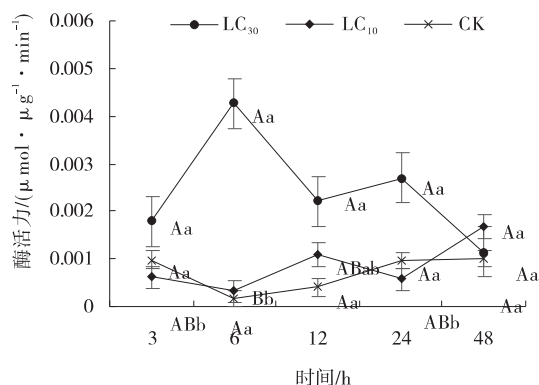


图 3 亚致死剂量三唑锡处理下二斑叶螨体内 MFOs 比活性
Fig. 3 The activity of MFOs in *T. urticae* under the treatment of sublethal does concentration of azacyclotin

应^[20]。亚致死剂量杀虫剂不仅对昆虫生长发育、繁殖力及抗性等有影响,也会对其体内多种解毒代谢酶产生诱导或抑制作用^[24-25]。而亚致死效应作为预测害虫种群发生动态和害虫抗药性监测的重要手段,其研究主要为体内的解毒酶(主要是 GSTs、CarEs 和 MFOs)的比活力变化。

本试验研究了三唑锡亚致死剂量处理二斑叶螨后,谷胱甘肽-S-转移酶、羧酸酯酶和多功能氧化酶的酶比活性在不同时间点的变化。用 LC_{30} 和 LC_{10} 处理二斑叶螨后,其体内 3 种解毒酶 LC_{30} 处理均高于 LC_{10} 处理且明显高于对照组,表明随着时间的变化药剂浓度越高酶比活性越高,说明三唑锡对 3 种解毒酶有抑制作用且浓度越高抑制作用越明显。这与前人报道的研究结果一致,如常芸等^[23]通过二斑叶螨经乙唑螨腈和联苯肼酯亚致死剂量(LC_{10} 、 LC_{30})处理后,其体内 GSTs 的酶比活性除乙唑螨腈 LC_{10} 处理在 12 h 和 24 h、联苯肼酯 LC_{10} 处理在 24 h 时表现为抑制作用外,其余时间段均较对照高,表现为激活作用。金晶等^[24]研究在亚致死剂量苦参碱处理后,二斑叶螨体内解毒酶比活性会随时间发生改变,但整体上,3 大解毒酶的比活性较对照都有所增加。李瑞娟等^[25]研究梅岭霉素和溴虫腈对二斑叶螨的抗性机理的影响发现在处理 6 h 后溴虫腈对 MFO 酶活力诱导显著,并且随着时间的增长酶活力增强,但在处理 24~48 h 处理组与对照组相比无显著差异。由此得出二斑叶螨对溴虫腈的代谢与 MFO 有关。杨娟生等^[26]研究发现致死剂量溴虫腈和毒死蜱亚处理等钳蠊螨(*Blattisocius dentriticus*) 24 h 后、GST 细胞色素 P450、CarE 的酶比活性较对照高且 P450 的酶比活性明显高于对照。

综上所述,本试验结果可为研究二斑叶螨的抗药性机制及三唑锡的合理使用提供前期理论依据。但试验仅测定了解毒酶比活性,继续探讨二斑叶螨对三唑锡的抗性需进行更深入的研究。

4 结论

本试验经过三唑锡处理二斑叶螨后,发现其体内 GSTs 酶比活性在 LC30 剂量下均高于 LC10(除 24 h 外)和对照。CarEs 酶比活性在 LC30 剂量下均高于 LC10 和对照。MFOs 酶比活性在 LC30 剂量均高于 LC10 和对照;LC10 剂量处理与 LC30 剂量处理相一致,均高于对照。说明 3 种解毒酶的酶比活性的变化与三唑锡的抗性有关。

参考文献:

- [1] 丁志宽,龚伟荣,胡婕,等.乙唑螨腈等 6 种药剂防治西瓜二斑叶螨的田间试验研究[J]. 现代农药,2020,19(5):48—51.
- [2] 刘庆娟,于毅,刘永杰,等.二斑叶螨的发生与防治研究进展[J]. 山东农业科学,2011(9):99—101.
- [3] 梁旭东,钟小刚,黄启明,等.兰州市苹果树病虫害发生情况调查[J]. 甘肃农业科技,2013,44(8):35—37.
- [4] 张廷伟,沈慧敏,钱秀娟,等.二斑叶螨刺吸胁迫对白三叶叶绿素含量和两种保护酶的影响[J]. 应用昆虫学报,2013,50(2):6.
- [5] 江晴.7 种杀螨剂常规使用浓度对柑橘全爪螨的防效[J]. 农药科学与管理,2012,33(9):48—51.
- [6] 张旭东,武荣祥,赵奇,等.陕西关中地区苹果园苹果全爪螨对 4 种杀螨剂的抗药性评估[J]. 西北林学院学报,2017,32(2):197—201.
- [7] 刘敏,李永涛,李婷,等.三唑锡亚致死浓度对土耳其斯坦叶螨运动速率的影响[J]. 应用昆虫学报,2015,52(3):67—73.
- [8] 安晓宁,秦国杰.20%三唑锡悬浮剂防治苹果红蜘蛛效果试验[J]. 山西农业科学,2020,48(11):1839—1840+1860.
- [9] 于士将,李鸿筠,冉春.20%四螨嗪·三唑锡悬浮剂防治柑桔全爪螨药效试验[J]. 中国南方果树,2014,43(6):52—53.
- [10] 吴有刚,金京,杨胜祥,等.昆虫抗药性产生机制[J]. 生物安全学报,2019,28(3):159—169.
- [11] Van Leeuwen T, Vontas J, Tsagkarakou A, et al. Tirry L. Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important

- Acari; a review[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2010, 40(8):563—572.
- [12] Vassiliou V A, Kitsis P. Acaricide resistance in *Tetranychus urticae*(Acari: Tetranychidae) populations from Cyprus[J]. *J. Econ Entomol*, 2013, 106(4):1848—1854.
- [13] FAO. Revised method for spider mites and their eggs (e. g. *Tetranychus* spp. and *Panonychus ulmi* Koch) [J]. FAO Plant Production and Protection, 1980, 21:49—54.
- [14] 汝阳,陈耀年,尚素琴,等.阿维菌素亚致死剂量对二斑叶螨解毒酶系的影响[J]. 甘肃农业大学学报,2017,52(1):87—91+96.
- [15] 何恒果.桔全爪螨对甲氰菊酯和阿维菌素的抗性及其酯酶基因的克隆与表达研究[D]. 重庆:西南大学,2010.
- [16] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein—dye binding[J]. *Analytical biochemistry*, 1976, 72(1—2):248—254.
- [17] Van Asperen K. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method[J]. *Insect Physiol*, 1962, 8(4):401—414.
- [18] Clark A G, Dick G L, Smith J N. Kinetic studies on a glutathione S-transferase from the larvae of *Costelytra zealandica* [J]. *Biochem*, 1984, 217(1):51—58.
- [19] Hansen L G, Hodgson E. Biochemical characteristics of insect microsomes N-and O-demethylation[J]. *Biochem Pharmacol*, 1971, 20(7):1569—1573.
- [20] 全林发,张怀江,孙丽娜,等.杀虫剂对害虫的亚致死效应研究进展[J]. 农学学报,2016,6(5):33—38.
- [21] 尹显慧,吴青君,李学锋,等.多杀菌素亚致死浓度对小菜蛾解毒酶系活力的影响[J]. 农药学学报,2008,10(1):28—34.
- [22] 张文成,王开运,牛芳,等.虫螨腈胁迫对甜菜夜蛾保护酶系和解毒酶系的诱导效应[J]. 植物保护学报,2009,36(5):455—460.
- [23] 常芸.二斑叶螨对亚致死浓度联苯肼酯和乙唑螨腈的响应及代谢的初步研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2020.
- [24] 金晶,杨顺义,尚素琴,等.苦参碱对二斑叶螨解毒酶活力的影响[J]. 草原与草坪,2020,40(6):89—94.
- [25] 李瑞娟,王开运,夏晓明.二斑叶螨对梅岭霉素和溴虫腈的抗性选育及其解毒酶活力变化[J]. 植物保护学报,2005,32(3):309—313.
- [26] 杨娟生,丛林,王翠伦,等.亚致死浓度溴虫腈和毒死蜱对等钳螨螨生长繁殖和解毒酶的影响[J]. 昆虫学报,2020,63(1):36—45.

Effect of sublethal doses of azocyclotin on detoxification enzymes in *Tetranychus urticus*

YE Tiao-qin, YANG Shun-yi, LI Wen-ping

(College of Plant Protection, Gansu Agricultural University/Laboratory of Biological Control of Crop Diseases and Pests of Gansu Province, Lanzhou 730070, China)

Abstract: To determine the effect of azocyclotin on the detoxification enzymes and resistance in *Tetranychus urticae*, cowpea leaves were sprayed to provide the sublethal doses LC₁₀ (0.159 mg/L) and LC₃₀ (0.247 mg/L) to the strain sensitive strain of *Tetranychus urticae* for different time period 3, 6, 12, 24 and 48 h. The changes of CarEs, glutathione-S-transferases (GSTs) and multifunctional oxidases (MFOs) enzymes in *T. urticae* were analysed in vivo. The results are as follows: after 3, 6, 12, 24 and 48 h treatment with LC₃₀ and LC₁₀, compare with that control, the enzyme activities of GSTs, CarEs and MFOs increased over time. All of them increased to different degrees and were significantly higher than that of control. Enzyme activity in LC₃₀ treatment group was significantly higher than that in LC₁₀ treatment group, reached the maximum at 6 h and 24 h. Enzyme activity of CarEs in LC₃₀ was higher than that in LC₁₀; Enzyme activity MFOs in LC₃₀ was higher than in LC₁₀. With the LC₁₀ treatment group the enzyme activity of CarEs and MFOs reached the maximum at 48 h. The activity of three detoxification enzymes increased with the increase of azocyclotin concentration.

Key words: *Tetranychus urticus*; azocyclotin; sublethal dose; detoxification enzymes

《草原与草坪》编辑部网络采编办公系统正式运行

各位作者及审稿专家:

您好! 为提高稿件处理和办公效率,《草原与草坪》编辑部已于 2021 年 7 月开始启用网络采编办公系统。

作者投稿采用新的网络平台 (<http://cyycp.ijournals.cn>), 请不要使用原电子邮件投稿, 特此公告, 望作者和审稿专家予以支持与合作。

在使用网络采编办公系统中您有任何疑问、意见和建议, 请您电话 0931-7631885 或者发邮件到 cyycp@gsau.edu.cn。