

棉铃虫对氰戊菊酯-辛硫磷混剂的抗性演化及解毒酶活性变化

杨恩会 林 雁* 吴益东**

(南京农业大学植物保护学院昆虫学系, 农业部病虫监测与治理重点开放实验室, 南京 210095)

摘要: 用氰戊菊酯-辛硫磷混剂(有效成分 1:10, 简称氰-辛混剂)对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 室内品系(YS)进行 16 代的抗性选育, 获得棉铃虫对氰-辛混剂的抗性品系(YS-FP)。YS-FP 品系与 YS 品系相比, 对氰-辛混剂的抗性为 14.7 倍, 对其中的单剂氰戊菊酯和辛硫磷的抗性分别为 2 170 倍和 3.1 倍。随着筛选的进行, 氰戊菊酯和辛硫磷之间的共毒系数在 F_2 代出现短暂的增加, 然后逐渐降低, 它们之间的互作由增效变为拮抗。交互抗性测定结果表明, YS-FP 品系对氯氰菊酯、溴氰菊酯、三氟氯氰菊酯、三唑磷和灭多威产生了明显的交互抗性, 对硫丹、多杀菌素和爱玛菌素没有产生交互抗性。YS-FP 品系 6 龄幼虫中肠细胞色素 P450 氧化酶甲氧基香豆素 O-脱甲基活性为 YS 品系的 10 倍, 3 龄幼虫谷胱甘肽 S-转移酶和酯酶活性分别是 YS 品系的 1.7 倍(CDNB 结合作用)和 2.4 倍(α -NA 酯酶水解作用)。氰-辛混剂的筛选导致了棉铃虫多种解毒酶活性的增加, 特别是细胞色素 P450 氧化酶活性增强最为明显。本研究结果表明氰-辛混剂对棉铃虫的筛选导致了广谱的交互抗性和多种代谢抗性机理, 并且两个单剂之间的互作由增效变为拮抗, 因此氰-辛混剂在棉铃虫抗性治理中的作用是有限的和暂时的。

关键词: 棉铃虫; 氰戊菊酯; 辛硫磷; 混剂; 抗性演化; 交互抗性; 解毒酶活性

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2006)02-0247-07

Resistance evolution and change of detoxification enzyme activity in a strain of *Helicoverpa armigera* selected with a mixture of fenvalerate and phoxim

YANG En-Hui, LIN Yan*, WU Yi-Dong** (Department of Entomology, College of Plant Protection & Key Laboratory of Monitoring and Management of Crop Diseases and Pest Insects, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The resistant YS-FP strain of *Helicoverpa armigera* was selected from the susceptible YS strain with a mixture of fenvalerate and phoxim (a.i., 1:10) for 16 generations. Compared with the YS strain, the YS-FP strain developed 14.7-fold resistance to the mixture itself, 2 170-fold resistance to fenvalerate and 3.1-fold resistance to phoxim. During 16 generations of continuous selection with the mixture, the co-toxicity coefficient decreased gradually after a brief increase at F_2 , and the interaction between fenvalerate and phoxim against the YS-FP strain changed from synergism to antagonism. The YS-FP strain had significant cross resistance to three pyrethroids (cypermethrin, deltamethrin and cyhalothrin), triazophos and methomyl, but no cross resistance to endosulfan, spinosad and emamectin. The cytochrome P450 oxidase O-demethylation activity in midguts of 6th instar larvae from the YS-FP strain was 10-fold of that from the YS strain; and the glutathione S-transferase activity (CDNB conjugation) and esterase activity (to the substrate α -naphthyl acetate) of 3rd instar larvae from the YS-FP strain were 1.7- and 2.4-fold respectively compared with the YS strain. The selection of the fenvalerate and phoxim mixture in the YS strain of *H. armigera* resulted in broad-spectrum cross resistance, multiple metabolic resistance mechanisms (especially enhanced cytochrome P450 oxidase) and antagonistic effect between fenvalerate and phoxim. The results suggested that the role of such fenvalerate and phoxim mixture in resistance management of *H. armigera* could be limited and temporary.

基金项目: 商品共同基金 (CFC) 资助项目 (CFC/ICAC14)

作者简介: 杨恩会, 男, 1970 年生, 博士研究生, 研究方向为昆虫分子毒理学, E-mail: enhuiyang@yahoo.com.cn

* 现工作单位: 南京市白蚁防治研究所

** 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: wyd@njau.edu.cn

收稿日期 Received: 2005-07-05; 接受日期 Accepted: 2005-11-22

Key words: *Helicoverpa armigera*; fenvalerate; phoxim; mixture; resistance evolution; cross resistance; detoxification enzyme activity

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 属鳞翅目夜蛾科, 主要为害棉花、蔬菜等经济作物, 是一种世界性农业害虫(Reed and Pawar, 1982)。棉铃虫在我国各棉区均有分布, 但以山东、河南、河北为中心的黄河流域棉区为害最重。在棉铃虫的综合防治中, 由于过分地依靠化学杀虫剂, 加之棉铃虫自身所具有的生态学和生物学特性(King, 1994), 致使棉铃虫对各类有机合成杀虫剂产生了抗性(Wilson, 1974; Gunning *et al.*, 1984; 沈晋良等, 1991; 吴益东等, 1996; McCaffery, 1998)。1997 年我国首先在河北省推广使用 Bt 抗虫棉, 此后 Bt 抗虫棉的种植面积迅速增加, 目前已经占我国棉花总面积的 66%(James, 2004)。Bt 抗虫棉生长后期的毒素蛋白表达量显著下降, 不足以有效控制棉铃虫的危害, 因此仍然需要使用拟除虫菊酯和有机磷类杀虫剂扑灭 Bt 抗虫棉上的残虫。

20 世纪 90 年代初, 随着棉铃虫在全国范围特大发生和华北棉区棉铃虫对拟除虫菊酯抗性的暴发, 以拟除虫菊酯和有机磷类杀虫剂复配而成的二元混剂被作为抗性治理的重要措施而得到了广泛使用, 并促进我国农药混配制剂的生产大幅度上升, 形成了我国农药生产的一大特点(吴士雄, 1994)。除了农药知识产权问题的大背景之外, 有两方面的原因促进了混剂的生产和使用。一是一部分拟除虫菊酯和有机磷类杀虫剂的混配制剂具有增效作用, 对抗性棉铃虫具有较好的防治效果; 二是认为拟除虫菊酯和有机磷类杀虫剂的混配制剂能够延缓抗药性。但是混配制剂是否能延缓抗药性的问题, 国内外历来存在争议。

魏岑等(1992)用氰戊菊酯、马拉硫磷和氰戊菊酯-马拉硫磷混剂分别对棉铃虫品系进行了 16 代的汰选, 这三种药剂汰选的品系对相应药剂的抗性分别为 68、7.8 和 3.5 倍, 因而认为增效混剂可以延缓抗性的发展, 并建议将增效混剂用于治理棉铃虫抗药性。魏岑等(1996)随后的研究表明拟除虫菊酯-有机磷增效混剂汰选的棉铃虫品系比拟除虫菊酯单剂汰选的品系的体壁穿透率高、神经敏感性也高, 从而认为混剂延缓棉铃虫抗药性与体壁穿透率、神经敏感性有关。尽管混剂汰选的棉铃虫品系对混剂的抗性发展速度远远慢于拟除虫菊酯单剂汰选品系抗性发展的速度, 但是混剂汰选的棉铃虫品系对拟除

虫菊酯单剂和其他药剂的交互抗性如何? 随着混剂汰选的进行, 拟除虫菊酯和有机磷类两个单剂之间的增效作用还存在吗? 混剂汰选后对解毒酶代谢的影响如何? 了解这些问题对于全面认识混剂延缓抗性的作用无疑是非常重要的。

本文作者采用在我国使用最为广泛的氰戊菊酯-辛硫磷混剂(氰-辛混剂), 在室内对棉铃虫进行了抗性选育, 监测了氰-辛混剂抗性品系对氰-辛混剂及其中的两个单剂(氰戊菊酯、辛硫磷)的抗性发展情况, 测定了其交互抗性谱和离体解毒酶的活性, 旨在全面了解棉铃虫对混剂的抗性发展规律和交互抗性情况, 明确抗性机制, 为混剂的科学合理利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

棉铃虫相对敏感品系(YS): 1991 年采自河南偃师, 在室内饲养期间不接触任何农药, 毒力测定结果表明该品系对常用杀虫剂为低水平抗性(<5 倍)。

氰-辛混剂抗性品系(YS-FP): 由相对敏感品系在室内经氰-辛混剂筛选获得。棉铃虫室内饲养参照谭福杰(1987)方法。

1.2 供试药剂和生化试剂

氰戊菊酯(90%), 常州农药厂; 氯氰菊酯(94%), 江苏丹阳农药厂; 溴氰菊酯(98%), 英国 Rothamsted Research; 三氟氯氰菊酯(98%), 先正达公司; 辛硫磷(80.5%), 青岛农药厂; 三唑磷(90%), 浙江省仙居农药厂; 灭多威(90%), 美国杜邦公司; 硫丹(95%), 美国杜邦公司; 多杀菌素(88%), 美国 Dow AgroScience; 爱玛菌素(95%), 诺华公司; 氰-辛混剂, 氰戊菊酯和辛硫磷有效成分配比为 1:10。

7-甲氧基香豆素(7-methoxycoumarin, MC), 还原型辅酶 II(NADPH), 1-氯-2,4-二硝基苯(1-chloro-2,4-dinitrobenzene, CDNB)均为 Sigma 公司产品; 固蓝 RR 盐, Fluka 公司产品; α -乙酸萘酯(α -naphthyl acetate, α -NA), 上海试剂一厂产品; 其他药品或试剂均为分析纯级产品。

1.3 毒力测定和抗性品系的选育

毒力测定采用点滴法, 方法参照吴益东等(1994)。用机率值分析法计算毒力回归线及 LD_{50}

值。在筛选试验中,以杀死种群 50% ~ 70% 的氰-辛混剂剂量处理 3 龄中期幼虫 2 000 ~ 3 000 头,将存活个体作为亲本饲养至下一代,如此连续筛选 16 代。每隔一代,分别测定氰-辛混剂、氰戊菊酯和辛硫磷的毒力,以监测其抗性变化动态。

共毒系数(co-toxicity coefficient, CTC)的计算按照 Sun 和 Johnson(1960)的方法。如果 $CTC > 120$,表明氰戊菊酯和辛硫磷之间具有增效作用;如果 CTC 在 80 ~ 120 之间,为相加作用;如果 $CTC < 80$,为拮抗作用。

1.4 交互抗性测定

当氰-辛混剂抗性品系(YS-FP)筛选至 16 代时,分别测定氯氰菊酯、溴氰菊酯、三氟氯氰菊酯、三唑磷、灭多威及硫丹、多杀菌素和爱玛菌素等杀虫剂对 YS-FP 品系和 YS 品系的毒力,以分析 YS-FP 品系对其他未用于筛选的药剂的交互抗性情况。

1.5 解毒代谢酶系研究

1.5.1 酶液准备: (1)棉铃虫 6 龄幼虫中肠酶液的制备:将棉铃虫 6 龄 2 日龄幼虫(300 ± 50 mg)置于冰上解剖,取出中肠,去除内含物,然后用冰冷的 0.1 mol/L pH 7.6 的磷酸缓冲液清洗干净。按 5 头中肠一组,加入 400 μ L 0.1 mol/L pH 7.6 的磷酸缓冲液(含 1 mmol/L EDTA、1 mmol/L DTT、1 mmol/L PTU、1 mmol/L PMSF 和 20% 甘油),用匀浆机在冰浴中匀浆,然后用 800 μ L 缓冲液洗涤匀浆棒和匀浆管,合并匀浆液;用冷冻离心机在 4℃、 $10\,000 \times g$ 条件下离心 20 min,转移上清液于另一新离心管中,在同样条件下再离心 20 min 后的上清液用于测定细胞色素 P450 氧化酶 O-脱甲基活性。(2)棉铃虫 3 龄幼虫酶液的制备:取棉铃虫单头 3 龄幼虫(9 ~ 11 mg),加入 500 μ L 0.1 mol/L pH 7.5 的磷酸缓冲液,用匀浆机在冰浴中匀浆。然后将匀浆液用冷冻离心机在 4℃、 $10\,000 \times g$ 条件下离心 10 min。上清液用于谷胱甘肽 S-转移酶和 α -NA 酯酶活性的测定。

1.5.2 细胞色素 P450 氧化酶 7-甲氧基香豆素 O-脱甲基活性测定:参照 Ullrich 和 Weber(1972)方法。在 96 孔酶标板中,每孔依次加入 80 μ L 0.5 mmol/L 的 7-甲氧基香豆素和 50 μ L 中肠酶液,在 30℃ 下平衡 5 min,然后加入 10 μ L 9.6 mmol/L 的还原型辅酶 II(NADPH)。用 Molecular Devices 公司的 SPECTRA MAX GEMINI XS 型酶标仪,在 380 nm 激发波长和 460 nm 发射波长下,每隔 30 s 记录一次荧光强度,共记录 15 min。反应阶段温度为 30℃。数据记录和处理由 Softmax[®] PRO 软件进行,以 7-羟基香豆素的

生成量表示酶活力($\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)。

1.5.3 谷胱甘肽 S-转移酶 CDNB 结合作用的测定:参照 Habig(1981)方法。在 96 孔酶标板中,每孔依次加入 100 μ L 1.2 mmol/L 的 CDNB、90 μ L 0.1 mol/L pH 7.6 的磷酸缓冲液、10 μ L 3 龄幼虫酶液和 100 μ L 6 mmol/L 还原型谷胱甘肽(GSH)。用 Molecular Devices 公司的 VERSAmax 酶标仪在 340 nm 波长下,每隔 15 s 记录一次光密度值,共记录 10 min。反应阶段温度为 30℃。数据记录和处理由 Softmax[®] PRO 软件进行,以 CDNB 消光系数 $9.6 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 计算酶活力($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)。

1.5.4 酯酶活性测定:参照 van Asperen(1962)方法。在 96 孔酶标板中,每孔加入 200 μ L α -NA 与固蓝 RR 盐的混合液(用 0.2 mol/L pH 6.0 的磷酸缓冲液配制,含 10 mmol/L α -NA 和 1 mmol/L 固蓝 RR 盐)。然后,在每孔中迅速加入 10 μ L 3 龄幼虫酶液。用 Molecular Devices 公司的 VERSAmax 酶标仪在 450 nm 波长下,每隔 30 s 记录一次光密度值,共记录 10 min。反应阶段温度为 27℃。数据记录和处理由 Softmax[®] PRO 软件进行,以 α -萘酚的生成量表示酶活力($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)。

1.6 蛋白质浓度测定

根据 Bradford(1976)方法进行,以牛血清白蛋白(BSA)作标准曲线。

2 结果与分析

2.1 棉铃虫氰-辛混剂选育品系对氰-辛混剂和两个单剂的抗药性发展动态

根据氰戊菊酯和辛硫磷对棉铃虫 YS 品系的毒力,按照等毒比原则,确定氰-辛混剂中氰戊菊酯和辛硫磷的配比为 1:10。棉铃虫 YS-FP 品系在氰-辛混剂筛选过程中对氰-辛混剂、氰戊菊酯、辛硫磷的抗性发展动态见表 1。

连续筛选到 F_{16} 代,YS-FP 品系对氰-辛混剂的 LD_{50} 由汰选前的 0.157 μ g/头上升到了 2.307 μ g/头,抗性达 14.7 倍,抗性呈平缓的上升趋势;对氰戊菊酯的抗性发展速度较快,到 F_{16} 代时其对氰戊菊酯的抗性已经超过了 2 170 倍;对辛硫磷的抗性发展比较缓慢,选育到 F_{16} 代时其抗性仅增长了 3.1 倍。由此可见,尽管氰-辛混剂筛选后的 YS-FP 品系对混剂本身抗性发展的速度不快,但对其中的单剂氰戊菊酯抗性发展的速度非常快。

表 1 氟戊菊酯-辛硫磷混剂筛选的棉铃虫抗性品系对氟-辛混剂及氟戊菊酯、辛硫磷的抗性发展

药剂 Insecticides	世代 Generation	斜率 Slope (± SE)	LD ₅₀ (μg/头)(95 % 置信限) LD ₅₀ (μg/larva)(95 % FL)	抗性倍数* RR*
氟戊菊酯-辛硫磷混剂 Fenvalerate/phoxim mixture	F ₀	2.433 ± 0.243	0.157 (0.128 ~ 0.192)	1.0
	F ₂	1.727 ± 0.246	0.255 (0.195 ~ 0.332)	1.6
	F ₄	2.649 ± 0.336	0.669 (0.553 ~ 0.830)	4.3
	F ₆	2.766 ± 0.334	0.738 (0.438 ~ 1.405)	4.7
	F ₈	2.741 ± 0.318	1.117 (0.929 ~ 1.348)	7.1
	F ₁₀	3.669 ± 0.427	1.216 (1.039 ~ 1.423)	7.7
	F ₁₂	3.711 ± 0.438	1.719 (1.471 ~ 2.009)	10.9
	F ₁₄	3.071 ± 0.352	1.857 (1.561 ~ 2.206)	11.8
	F ₁₆	3.060 ± 0.405	2.307 (1.159 ~ 3.031)	14.7
氟戊菊酯 Fenvalerate	F ₀	1.214 ± 0.221	0.046 (0.027 ~ 0.066)	1.0
	F ₂	1.265 ± 0.253	0.438 (0.282 ~ 1.007)	9.5
	F ₄	0.978 ± 0.259	1.813 (0.871 ~ 14.317)	39.4
	F ₆	0.911 ± 0.225	9.781 (5.955 ~ 27.350)	213
	F ₈	0.865 ± 0.222	18.841 (11.273 ~ 56.135)	410
	F ₁₀	0.998 ± 0.223	28.786 (18.812 ~ 58.183)	626
	F ₁₂	1.158 ± 0.233	71.425 (48.047 ~ 139.562)	1 550
	F ₁₄	—	> 100	> 2 170
	F ₁₆	—	> 100	> 2 170
辛硫磷 Phoxim	F ₀	2.406 ± 0.241	0.449 (0.363 ~ 0.575)	1.0
	F ₂	1.994 ± 0.271	0.817 (0.543 ~ 1.488)	1.8
	F ₄	2.158 ± 0.312	1.141 (0.899 ~ 1.567)	2.5
	F ₆	2.821 ± 0.323	1.002 (0.836 ~ 1.204)	2.2
	F ₈	2.581 ± 0.320	1.138 (0.920 ~ 1.379)	2.5
	F ₁₀	2.366 ± 0.305	1.280 (1.006 ~ 1.574)	2.9
	F ₁₂	3.018 ± 0.363	1.489 (1.036 ~ 2.041)	3.3
	F ₁₄	2.719 ± 0.378	1.519 (0.625 ~ 2.405)	3.4
	F ₁₆	2.538 ± 0.373	1.373 (0.668 ~ 2.037)	3.1

* 抗性倍数 = F_x 代的 LD₅₀/F₀ 代的 LD₅₀ * RR = LD₅₀ of F_x/LD₅₀ of F₀.

2.2 氟-辛混剂筛选过程中氟戊菊酯和辛硫磷之间共毒系数的变化

在氟-辛混剂筛选过程中,氟戊菊酯和辛硫磷之间共毒系数的变化情况见图 1。由图 1 可以看出,在棉铃虫抗性选育开始前(F₀代),氟戊菊酯和辛硫磷对棉铃虫具有增效作用(CTC = 154)。随着筛选的进行,氟戊菊酯和辛硫磷之间的共毒系数在 F₂代达到最高(CTC = 297),之后开始逐渐下降,至 F₆代仍具有增效作用;在 F₈代~F₁₄代之间,氟戊菊酯和辛硫磷之间的互作表现为相加作用(CTC 在 110~90 之间);到 F₁₆代,氟戊菊酯和辛硫磷之间的互作变为拮抗作用(CTC = 65)。这说明,随着混剂的连续使用,即使是增效混剂也会失去其原有的增效作用,甚至产生拮抗作用。

2.3 氟-辛混剂选育品系的交互抗性谱

棉铃虫 YS-FP 品系选育至 16 代时,分别测定了其对于氟戊菊酯、溴氟菊酯、三氟氯氟菊酯、三唑磷、灭多威、硫丹、多杀菌素和爱玛菌素的交互抗性,交互

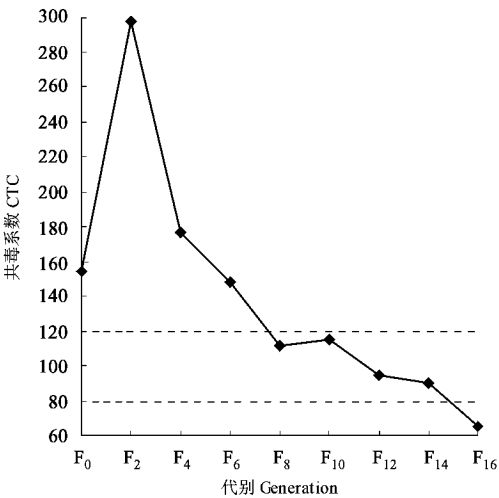


图 1 氟戊菊酯与辛硫磷之间的共毒系数(CTC)随棉铃虫 YS-FP 品系选育代数的变化趋势
Fig. 1 The trend of co-toxicity coefficient (CTC) between fenvalerate and phoxim during selection of the YS-FP strain of *Helicoverpa armigera*

抗性测定结果见表 2。棉铃虫 YS-FP 品系在对氰-辛混剂及相应单剂产生抗性的同时,对氯氰菊酯、溴氰菊酯和三氟氯氰菊酯等供试拟除虫菊酯类杀虫剂均产生了严重的交互抗性,抗性水平分别达 1 850 倍、7 140倍和 3 830 倍。在供试的有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂中,YS-FP 品系对三唑磷的抗性是 14.7 倍,对灭多威的抗性是 27.8 倍。YS-FP 品系对硫丹、多杀菌素和爱玛菌素没有产生交互抗性。由此可见,氰-辛混剂对棉铃虫的选育导致了比较广谱的交互抗性。

2.4 氰-辛混剂选育品系的代谢抗性机理

最近的研究表明,氧化解毒代谢增强是棉铃虫

对拟除虫菊酯的重要抗性机理(Yang *et al.* , 2004 ; Chen *et al.* , 2005)。由于 YS-FP 品系对拟除虫菊酯产生了极高水平的抗性,我们对 YS-FP 和 YS 品系 6 龄幼虫中肠细胞色素 P450 氧化酶、3 龄幼虫谷胱甘肽 S-转移酶和酯酶进行了研究。从表 3 可以看出,YS-FP 品系细胞色素 P450 氧化酶的 7-甲氧基香豆素 O-脱甲基活性(MCOD)是 YS 品系的 10 倍;YS-FP 品系 3 龄幼虫谷胱甘肽 S-转移酶活性 CDNB 结合作用和酯酶水解 α-NA 活性分别是 YS 品系的 1.7 倍和 2.4 倍。这表明氰-辛混剂的筛选导致 YS-FP 品系的多种解毒代谢酶活性明显升高,尤以细胞色素 P450 氧化酶活性增长倍数最高。

表 2 棉铃虫 YS-FP 品系的交互抗性谱

药剂 Insecticides	LD ₅₀ (μg/头) LD ₅₀ (μg/larva)*		抗性倍数 RR**
	YS-FP 品系 YS-FP strain	YS 品系 YS strain	
氯氰菊酯 Cypermethrin	> 100	0.054	> 1 850
溴氰菊酯 Deltamethrin	> 100	0.014	> 7 140
三氟氯氰菊酯 Cyhalothrin	23.0	0.006	3 830
三唑磷 Triazophos	16.02	1.09	14.7
灭多威 Methomyl	3.87	0.139	27.8
硫丹 Endosulfan	0.98	0.348	2.8
多杀菌素 Spinosad	0.11	0.054	2.0
爱玛菌素 Emamectin	0.004	0.0037	1.1

* 3 种拟除虫菊酯的 LD₅₀ 引自 Yang 等(2005)。* LD₅₀ values of three pyrethroids are adapted from Yang *et al.* (2005).

** 抗性倍数 = YS-FP 品系的 LD₅₀/YS 品系的 LD₅₀。 ** RR = LD₅₀ of YS-FP strain/LD₅₀ of YS strain.

表 3 棉铃虫 YS-FP 品系和 YS 品系的解毒酶活性

解毒酶 Detoxification enzymes	酶活性 Enzyme activity		
	YS-FP 品系 YS-FP strain	YS 品系 YS strain	活性比 YS-FP/YS
6 龄幼虫中肠 Midguts of six instar larvae*			
细胞色素 P450 氧化酶 O-脱甲基作用 Cytochrome P450 oxidase O-demethylase (pmol · min ⁻¹ · mg ⁻¹)	11.8 ± 1.83**	1.17 ± 0.42	10
3 龄幼虫 Third instar larvae			
谷胱甘肽 S-转移酶 CDNB 结合作用 Glutathione S-transferase CDNB conjugation (nmol · min ⁻¹ · mg ⁻¹)	1275 ± 57.9**	745 ± 73.9	1.7
水解酶 (α-NA) α-NA esterase (nmol · min ⁻¹ · mg ⁻¹)	384 ± 19.2**	163 ± 19.6	2.4

* 中肠氧化酶活性的数据引自 Yang 等(2005)。* Data of midgut oxidase activity are adapted from Yang *et al.* (2005).

** 与 YS 品系差异显著(*P* < 0.05)。 ** Value significantly different from the YS strain (*P* < 0.05).

3 讨论

在 Georgiou 和 Saito (1983)提出的害虫抗性治理三个基本策略中,杀虫剂混用或混剂是多点攻击(multiple attack)策略的主要措施。多点攻击策略延缓害虫抗性发展的原理是根据药剂对生物的多位点作用,使目标害虫不易产生抗性。然而除了无机农药外,一种有机合成农药很难具有多位点作用机制。

因此又提出利用几种作用机制不同的农药混合使用或混剂来延缓害虫抗性的发展。

通过对群体遗传理论模型的研究, Curtis (1985)、Man(1985)和 Roush(1989)等认为能延缓害虫抗性发展的混剂必须具备下列条件(1)害虫对混剂中各单剂的抗性基因是相互独立而非连锁的(2)抗性基因的初始频率较低(3)害虫对混剂中各单剂的抗性均为单基因控制的隐性遗传(4)混剂中各单剂的残效期一致。吴益东等(1995)报道,棉铃虫对

氰戊菊酯的抗性为多基因遗传,其主要基因为不完全显性的常染色体遗传,棉铃虫对辛硫磷的抗性为单基因控制的不完全显性的常染色体遗传(本实验室未发表资料)。尽管氰戊菊酯和辛硫磷作用机制不同,且在一定阶段能够相互增效,在一定程度上能够降低田间选择压,但由于棉铃虫对氰戊菊酯和辛硫磷的主导抗性机制均为解毒代谢增强,控制抗性的主要基因为不完全显性,且二者的残效期也不尽相同。因此,氰-辛混剂不具备延缓棉铃虫抗性发展的理论基础。本研究结果也证明了这一点。

魏岑等(1992)报道,用氰戊菊酯对棉铃虫汰选16代(其中一次未用药)后,抗性上升了68倍。吴益东等(1994)报道,用氰戊菊酯对田间棉铃虫进行抗性选育,在室内饲养15代,其中有9代经过筛选,抗性比筛选前提高了119.5倍;慕立义等(1995)在室内用氰戊菊酯对棉铃虫选育15代,抗性提高了311倍;范贤林等(1996)报道,经21次汰选后棉铃虫氰戊菊酯抗性品系的抗性水平与敏感品系相比,由未汰选前的16.8倍上升到141.6倍。比较以上数据可以看出,单用氰戊菊酯对棉铃虫进行筛选时,经过9至21代的筛选抗性提高10~311倍。而本研究结果表明,棉铃虫经氰-辛混剂选育16代后,尽管对氰-辛混剂的抗性发展速度不快,但对氰戊菊酯的抗性却提高了2170倍,比单剂选育的抗性品系对氰戊菊酯的抗性发展速度快得多。因此,在进行氰-辛混剂抗性风险评估时,还需要考虑混剂筛选后对其中单剂抗性发展的影响。

棉铃虫用氰-辛混剂筛选后,不但对组成混剂的氰戊菊酯、辛硫磷产生了抗性,而且对多种拟除虫菊酯类杀虫剂、三唑磷和灭多威都产生了严重的交互抗性。解毒酶活性研究表明,氰-辛混剂筛选后的YS-FP品系存在以细胞色素P450氧化酶解毒代谢增强为主的多种代谢抗性机制。由共毒系数的变化趋势可以看出,在棉铃虫抗性选育的起始阶段,氰-辛混剂对棉铃虫具有显著的增效作用,但随着棉铃虫抗性的发展,氰戊菊酯和辛硫磷之间的共毒系数逐渐降低,二者之间的互作由增效作用变为相加作用,最后变为拮抗作用。这表明,随着害虫抗性的发展,即使是增效混剂也会失去其原有的增效作用。

如何使混剂在延缓害虫抗性发展的同时,又能够避免害虫多种抗药性的产生,是农药混剂研制或混合使用中必须考虑和加以解决的问题。从混剂延缓抗性的基本原理上分析,靶标害虫对各单剂的潜在主导抗性基因不同,并为隐性(通常为靶标不敏感

性)时,混剂才可能延缓抗性。例如美国孟山都公司开发的第二代转基因抗虫棉含有两个Bt基因(Cry1Ac和Cry2Ab),室内筛选研究表明靶标害虫烟芽夜蛾*Heliothis virescens*对这两种毒素没有交互抗性,且抗性都是隐性遗传,因此可以用来延缓抗性。在害虫防治中,只有科学合理地研制和使用混剂,才能充分发挥其在抗性治理中的积极作用。因此,农药登记部门在接受以延缓害虫抗药性为主要目的的农药登记时,应要求混剂生产单位提供相应的混剂延缓害虫抗药性的评估报告。

参考文献 (References)

- Bradford WW, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248–254.
- Chen S, Yang YH, Wu YD, 2005. Correlation between fenvalerate resistance and cytochrome P450-mediated O-demethylation activity in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 98(3): 943–946.
- Curtis CF, 1985. Theoretical models of the use of insecticide mixtures for management of resistance. *Bull. Entomol. Res.*, 75: 259–265.
- Fan XL, Lu MG, Zhao YQ, Rui CH, Wei C, 1996. Resistant development of cotton bollworm against fenvalerate and cross-resistance. *Plant Protection*, 22(4): 24–26. [范贤林, 卢美光, 赵永巧, 芮昌辉, 魏岑, 1996. 抗氰戊菊酯棉铃虫品系的抗性发展及交互抗性水平. 植物保护, 22(4): 24–26]
- Georghiou GP, Saito T, 1983. *Pest Resistance to Pesticides*. New York and London: Plenum Press. 769–792.
- Gunning RV, Easton CS, Greenup LR, Edge VE, 1984. Pyrethroid resistance in Australian *Helicoverpa armigera*. *Pestic. Sci.*, 33: 473–490.
- Habig WH, 1981. Assays for differentiation of glutathione S-transferase. In: William BJ ed. *Method in Enzymology*. New York: Academic Press. 398–405.
- James C, 2004. Preview: Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2004. ISAAA Briefs No. 32. ISAAA: Ithaca, NY.
- King ABS, 1994. *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae). In: Matthews GA, Tunstall JP eds. *Insect Pests of Cotton*. Wallingford, UK: CAB International. 39–106.
- Mani GS, 1985. Evolution of resistance in the presence of two insecticides. *Genetics*, 109: 761–783.
- McCaffery AR, 1998. Resistance to insecticide in heliothine Lepidoptera: a global view. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B*, 353(1376): 1735–1750.
- Mu LY, Wang KY, Liu F, Yi MQ, Mu W, Zhang X, 1995. A survey on the resistance of cotton bollworm (*Heliothis armigera* Hübner) to insecticides and a study on the rule of insecticide resistance. *Pesticide*, 34(6): 6–9. [慕立义, 王开运, 刘峰, 仪美芹, 慕卫, 张新, 1995. 棉铃虫抗药性调查及抗性规律的研究. 农药, 34(6): 6–9]
- Reed W, Pawar CS, 1982. *Heliothis*: A global problem. In: Proceedings of

the International Workshop on *Heliothis* Management. 15-20 Nov. , 1981 , ICRISAT Center , Palancheru , AP , India. 9 – 14 .

Roush RT , 1989. Designing resistance management programs : How can you choose ? *Pesticide Science* , 26 : 423 – 441 .

Shen JL , Tan JG , Xiao B , Tan FJ , You ZP , 1991. Monitoring and forecasting of pyrethroids resistance of *Heliothis armigera* (Hübner) in China. *Entomological Knowledge* , 28(6) : 337 – 341 . [沈晋良 , 谭建国 , 肖斌 , 谭福杰 , 尤子平 , 1991. 我国棉铃虫对拟除虫菊酯类农药的抗性监测及预报 . 昆虫知识 , 28(6) : 337 – 341]

Sun YP , Johnson ER , 1960. Analysis of joint action of insecticides against houseflies. *J. Econ. Entomol.* , 53 : 887 – 891 .

Tan FJ , 1987. Methods for testing resistance of agricultural pests to pesticides. *J. Nanjing Agri. Univ.* , 10(Suppl.) : 107 – 122 . [谭福杰 , 1987. 农业害虫抗药性测定方法 . 南京农业大学学报 , 10(增刊) : 107 – 122]

Ullrich V , Weber P , 1972. The O-dealkylation of 7-ethoxycoumarin by liver microsomes. A direct fluorometric test. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* , 353(7) : 1 171 – 1 177 .

van Asperen K , 1962. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *J. Insect Physiol.* , 8 : 401 – 416 .

Wei C , Ru LJ , Fan XL , Zhao YQ , Meng XQ , Liu AX , Zhao Y , 1996. The mechanisms of synergistic insecticide mixtures to delay development of pyrethroid resistance in cotton bollworm. *Acta Phytohy. Sin.* , 23(2) : 152 – 156 . [魏岑 , 茹李军 , 范贤林 , 赵永巧 , 孟香清 , 刘安西 , 赵勇 , 1996. 增效混剂延缓棉铃虫对菊酯农药抗性机制的研究 . 植物保护学报 , 23(2) : 152 – 156]

Wei C , Zhao YQ , Fan XL , Rui CH , Wang WL , Sun XP , 1992. Studies of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) resistance selections of fenvalerate , malathion and their mixture. *Scientia Agricultura Sinica* , 25(6) : 9 – 14 . [魏岑 , 赵永巧 , 范贤林 , 芮昌辉 , 王文来 , 孙小平 , 1992. 氟戊菊酯、马拉硫磷及其混剂汰选选育棉铃虫抗药性研究 . 中国农业科学 , 25(6) : 9 – 14]

Wilson AGL , 1974. Resistance of *Heliothis armigera* to insecticides in the Ord Irrigation Area , North Western Australia. *J. Econ. Entomol.* , 67 : 256 – 258 .

Wu SX , 1994. The trend of pesticides development in the world. *Plant Protection* , 20(4) : 34 – 36 . [吴士雄 , 1994. 国内外农药发展动态与趋势 . 植物保护 , 20(4) : 34 – 36]

Wu YD , Shen JL , Chen J , Lin XW , Li AM , 1996. Evaluation of two resistance monitoring methods in *Helicoverpa armigera* : Topical application method and leaf dipping method. *Plant Protection* , 22(5) : 3 – 6 . [吴益东 , 沈晋良 , 陈进 , 林祥文 , 李爱玫 , 1996. 用点滴法和浸叶法监测棉铃虫抗药性的比较 . 植物保护 , 22(5) : 3 – 6]

Wu YD , Shen JL , Tan FJ , You ZP , 1995. Mechanism of fenvalerate resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner). *J. Nanjing Agri. Univ.* , 18(2) : 63 – 68 . [吴益东 , 沈晋良 , 谭福杰 , 尤子平 , 1995. 棉铃虫对氟戊菊酯抗性机理研究 . 南京农业大学学报 , 18(2) : 63 – 68]

Wu YD , Shen JL , You ZP , 1994. Laboratory selection for fenvalerate resistant and susceptible strains in cotton bollworm , *Heliothis armigera* (Hübner). *Acta Entomol. Sin.* , 37(2) : 129 – 136 . [吴益东 , 沈晋良 , 尤子平 , 1994. 棉铃虫对氟戊菊酯抗性品系和敏感品系的选育 . 昆虫学报 , 37(2) : 129 – 136]

Yang EH , Yang YH , Wu SW , Wu YD , 2005. Relative contribution of detoxifying enzymes to pyrethroid resistance in a resistant strain of *Helicoverpa armigera* . *Journal of Applied Entomology* , 129 : 521 – 525 .

Yang YH , Wu YD , Chen S , Devine GJ , Denholm I , Jewess P , Moores GD , 2004. The involvement of microsomal oxidases in pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera* from Asia. *Insect Biochem. Mol. Biol.* , 34 : 763 – 773 .

(责任编辑 : 黄玲巧)