# 茚虫威对草地贪夜蛾的毒力及解毒酶的诱导作用

王芹芹[1]， 崔 丽[1]， 王 立[1]， 黄伟玲[1]， 代黎明[2]， 袁会珠[1*]， 芮昌辉[1*]

（1. 中国农业科学院植物保护研究所，农业农村部作物有害生物综合治理重点实验室，北京 100193；
2. 集宁师范学院，乌兰察布 012000）

**摘要** 茚虫威对鳞翅目害虫幼虫具有卓越的杀虫活性，是替代传统杀虫剂及治理抗药性害虫的理想药剂。为了明确茚虫威对草地贪夜蛾的生物活性及对其主要解毒酶活性的影响，为使用茚虫威科学防治草地贪夜蛾提供参考，本研究采用浸叶法测定了广西南宁草地贪夜蛾种群3龄幼虫对茚虫威敏感性及增效醚（PBO）、磷酸三苯酯（TPP）、顺丁烯二酸二乙酯（DEM）对茚虫威的增效作用；并测定了亚致死浓度（$LC_{20}$）茚虫威对草地贪夜蛾体内MFO、GSTs和CarE酶的诱导作用。结果表明，茚虫威对草地贪夜蛾的$LC_{20}$、$LC_{50}$和$LC_{90}$分别为8.95、20.62 mg/L和73.57 mg/L。DEM、PBO和TPP对茚虫威的增效倍数依次为2.24、2.05和0.50倍。亚致死浓度（$LC_{20}$）茚虫威处理后对3龄幼虫体内GSTs的活性和MFO含量与无药剂处理（CK）相比显著升高（$P<0.05$），而CarE活性无显著变化（$P>0.05$）。本文结果显示，广西草地贪夜蛾仍可以用推荐剂量80 mg/L茚虫威防治，而代谢抑制剂PBO和DEM对茚虫威有明显的增效作用，且GSTs活性和MFO含量在茚虫威诱导后显著升高，初步推测这两种解毒酶可能影响将来草地贪夜蛾对茚虫威的抗药性发展。

**关键词** 草地贪夜蛾； 茚虫威； 代谢抑制剂； 增效作用； 解毒酶

**中图分类号：** S 481.1 **文献标识码：** A **DOI：** 10.16688/j.zwbh.2019557

# Toxicity of indoxacarb to *Spodoptera frugiperda* and induction of its detoxifying enzymes

WANG Qinqin[1]， CUI Li[1]， WANG Li[1]， HUANG Weiling[1]， DAI Liming[2]， YUAN Huizhu[1*]， RUI Changhui[1*]

（1. *Key Laboratory of Integrated Pest Management in Crops*，*Ministry of Agriculture and Rural Affairs*，*Institute of Plant Protection*，*Chinese Academy of Agricultural Sciences*，*Beijing* 100193，*China*；
2. *Jining Normal University*，*Wulanchabu* 012000，*China*）

**Abstract** Indoxacarb has excellent insecticidal activity against the larvae of lepidoptera pests. It is an ideal agent to replace traditional insecticides and control resistance pest. To provide guideline for its scientific application, the biological activity of indoxacarb and its induction to the detoxifying enzymes of *Spodoptera frugiperda* were investigated in this study. The sensitivity of 3rd instar larvae to indoxacarb and the synergistic effects of PBO, TPP and DEM to indoxacarb were determined by leaf dipping method. In addition, the induction of MFO, GSTs and CarE enzyme by $LC_{20}$ of indoxacarb was determined. The results showed that the $LC_{20}$, $LC_{50}$ and $LC_{90}$ values of indoxacarb were 8.95, 20.62 mg/L and 73.57 mg/L, respectively. The synergistic ratios of DEM, PBO and TPP to indoxacarb were 2.24, 2.05 and 0.50, respectively. Treatment with $LC_{20}$ of indoxacarb significantly increased the GSTs activity and MFO content in the 3rd instar larva compared with that of untreated control (CK) ($P<0.05$), but showed no effect on the CarE activity ($P>0.05$). These results suggested that the indoxacarb could still be used to prevent and control the *S. frugiperda* at the recommended dose of 80 mg/L, while the metabolic inhibitors PBO and DEM had obvious synergistic effects on indoxacarb, and GSTs activity and MFO content were significantly induced by $LC_{20}$ of indoxacarb. It was preliminarily speculated that these two enzymes might be involved in the development of indoxacarb resistance in future.

**Key words** *Spodoptera frugiperda*； indoxacarb； metabolic inhibitor； synergistic ratios； detoxification enzyme

**收稿日期：** 2019－10－18 **修订日期：** 2019－10－22
**基金项目：** 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项（Y2019YJ06）；国家重点研发计划（2016YFD0200504）
* 通信作者 E-mail：袁会珠 hzhyuan@ippcaas.cn；芮昌辉 chrui@ippcaas.cn

草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)属鳞翅目 Lepidoptera 夜蛾科 Noctuidae 灰翅夜蛾属 *Spodoptera*,又名秋黏虫[1]。我们在广西南宁市坛洛镇的田间调查发现,其对玉米的为害十分严重,平均每株见虫 5.4 头(未发表数据),且世代重叠,虫龄很不整齐。这使得草地贪夜蛾的防治适期和用药量不容易掌握,容易导致多次重复用药,增加了化学农药防治该害虫的难度。非洲已登记防治草地贪夜蛾药剂主要包括传统杀虫剂如毒死蜱(chlorpyrifos)、马拉硫磷(malathion)、灭多威(methomyl)、克百威(carbofuran)、高效氯氰菊酯(*beta*-cypermethrin)、杀螟丹盐酸盐(cartap hydrochloride),生物农药如苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* 和球孢白僵菌 *Beauveria bassiana*,苯甲酰脲类杀虫剂如虱螨脲(lufenuron)和除虫脲(diflubenzuron),以及新型低毒高效杀虫剂如乙基多杀菌素(spinetoram)、甲氨基阿维菌素苯甲酸盐(emamectin benzoate)、氯虫苯甲酰胺(chlorantraniliprole)、氟苯虫酰胺(flubendiamide)和茚虫威(indoxacarb)等[2]。以上药剂大部分也被列进农业农村部推荐的草地贪夜蛾应急防治用药名单。其中茚虫威作为单剂或与甲氨基阿维菌素苯甲酸盐的复配制剂被推荐用于应急防治草地贪夜蛾[3]。截至 2019 年 8 月份,我国登记茚虫威原药企业有 11 家,母药企业 23 家;已登记的茚虫威单剂产品共计 121 个,其登记剂型主要包括悬浮剂(53.72%)、水分散粒剂(26.45%)、乳油(4.96%)、饵剂(12.40%)和其他剂型(粉剂、微乳剂、超低容量液剂,2.48%),主要用于防治鳞翅目害虫如小菜蛾 *Plutella xylostella*、甜菜夜蛾 *S. exigua* 和斜纹夜蛾 *S. litura* 等重要农作物害虫,并在田间表现出良好的防治效果。

茚虫威属噁二嗪类杀虫剂,其作用机制独特,是治理卫生害虫(白蚁和蟑螂)及鳞翅目害虫的首选药剂,在我国已使用近二十年[4-7]。在草地贪夜蛾防治方面,尹艳琼等[8]测定了 8 种杀虫剂对滇西南、滇南、滇中和滇东北 4 个区域 5 个草地贪夜蛾种群 3 龄幼虫的毒力,其中 30%茚虫威 SC 的 $LC_{50}$ 为 23.79～40.41 mg/L,而赵胜园等[9]在草地贪夜蛾入侵之初测定 15%茚虫威 SC 稀释 3 500 倍对云南省普洱地区 2 龄草地贪夜蛾室内防效为 46.67%±9.43%,相当于死亡率 50%左右时有效剂量在 40 mg/L左右,表明草地贪夜蛾对茚虫威的敏感性目前尚无显著变化。

增效醚(PBO)、磷酸三苯酯(TPP)的顺丁烯二酸二乙酯(DEM)分别是多功能氧化酶、羧酸酯酶和谷胱甘肽 *S*-转移酶的高效抑制剂[12-13]。研究这些抑制剂对杀虫剂的增效作用有助于了解害虫对杀虫剂的抗性机制。在实际生产中,随着施药后时间的延长和农作物的生长,害虫接触农药的剂量逐渐下降,使其可能暴露于不足以杀死其个体的亚致死浓度下。而亚致死浓度药剂可以诱导害虫的解毒酶活性[7,10-11],增强其对外源化合物的解毒代谢能力,进而影响害虫对杀虫剂的敏感性。基于此,我们以采自广西南宁的草地贪夜蛾种群为对象研究了茚虫威对该种群的毒力,PBO、TPP 和 DEM 对茚虫威的增效作用以及亚致死浓度的茚虫威对草地贪夜蛾解毒酶的诱导作用,初步探索草地贪夜蛾对茚虫威抗药性形成的生化机制。

## 1　材料与方法

### 1.1　供试虫源

草地贪夜蛾于 2019 年 6 月采自广西南宁(22.45°N,108.30°E)玉米田,室内用玉米粉和啤酒酵母等制备的人工饲料饲养。饲养条件:温度(27±1)℃,相对湿度 80%～90%,光周期 L∥D=14 h∥10 h。

### 1.2　试验方法

#### 1.2.1　茚虫威对草地贪夜蛾 3 龄幼虫的毒力测定

采用浸叶法。称取 95%茚虫威(indoxacarb)原药(以色列马克西姆化学公司)0.2 g,用 9.5 mL 二甲基甲酰胺(DMF)完全溶解,配制成含有效成分为 2%的茚虫威母液;然后以 0.05%的曲拉通 X-100 稀释,配制 5～7 个药剂浓度。将玉米叶剪成适合大小的叶片在药液中浸渍 10 s,取出晾干后放入 10 孔细胞培养板中,接入大小一致的草地贪夜蛾 3 龄初幼虫,每孔 1 头,每处理 10 头,每处理 3 次重复。在(25±1)℃下 48 h 后检查死亡虫数,以解剖针轻触虫体,不能正常爬行视为死亡。

#### 1.2.2　三种增效剂对茚虫威的增效作用测定

方法参考王芹芹等[14],略有改动。将 100 mg/L 的 PBO、DEM 和 TPP 分别添加到 5～7 个浓度的茚虫威药液中,采用上述浸叶法进行生物测定。

#### 1.2.3　亚致死浓度茚虫威对草地贪夜蛾解毒酶的诱导作用

用经 $LC_{20}$(8.95 mg/L)的茚虫威浸叶处理的玉米幼嫩叶片饲喂草地贪夜蛾 3 龄幼虫 48 h,取存活的草地贪夜蛾幼虫 5 头制备粗酶液,作为待测酶液,每处理重复 3 次。多功能氧化酶(MFO)的含量和谷胱甘肽 *S*-转移酶(GSTs)的活性均用待测酶液测

定，羧酸酯酶(CarE)的活性将待测酶液用 0.1 mol/L 的 PBS 缓冲液(pH 7.0)稀释 20 倍后进行测定。以 0.05%的曲拉通 X-100 水溶液处理的玉米叶片饲喂草地贪夜蛾作为对照。具体方法参照王芹芹等[14-15]。

**1.2.4** 酶液中总蛋白含量测定

采用 Bradford[16]的考马斯亮蓝(G-250)方法测定酶液中总蛋白含量。

### 1.3 统计分析

采用 DPS version 7.05 软件计算毒力回归方程和致死中浓度，增效倍数为茚虫威单剂的 $LC_{50}$ 与茚虫威+增效剂的 $LC_{50}$ 的比值。酶活性用 DPS version 7.05 进行方差分析，Origin 8 制图软件制图。

## 2 结果与分析

### 2.1 茚虫威对草地贪夜蛾的毒力及增效剂的增效作用

如表 1，茚虫威对广西草地贪夜蛾种群的 $LC_{50}$ 和 $LC_{90}$ 分别为 20.62 mg/L 和 73.57 mg/L。从不同增效剂对茚虫威的增效作用来看，DEM 和 PBO 对茚虫威显示出较高的增效作用，分别增效 2.24 倍和 2.05 倍，而 TPP 则对茚虫威基本没有增效作用，增效倍数仅为 0.50 倍。结果初步表明草地贪夜蛾对茚虫威的抗性与谷胱甘肽 S-转移酶和多功能氧化酶活性升高有关，而与羧酸酯酶无关，同时利用增效剂能够提高茚虫威对草地贪夜蛾的防治效果。

**表 1 茚虫威对草地贪夜蛾的毒力及 DEM，PBO 和 TPP 对茚虫威的增效作用1)**

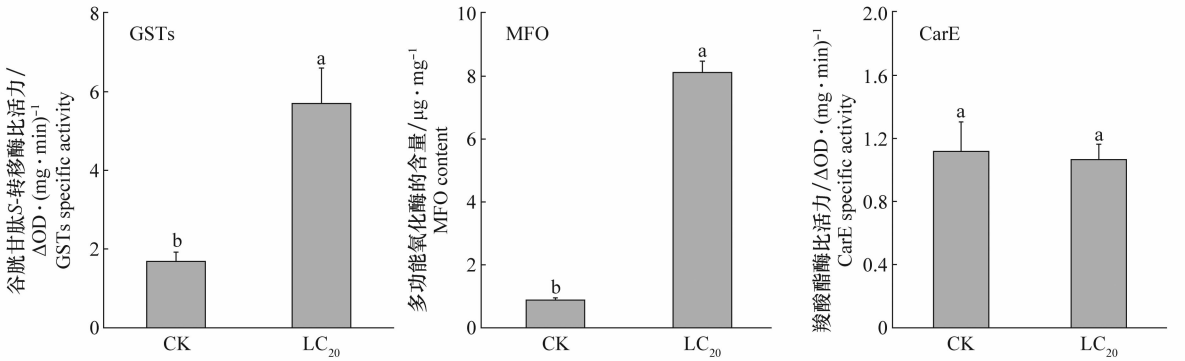
**Table 1 Toxicity of indoxacarb and synergism of DEM, PBO and TPP to indoxacarb against *Spodoptera frugiperda***

| 杀虫剂 Insecticide | 斜率 Slope±SE | 致死中浓度(95%置信区间)/mg·L$^{-1}$ $LC_{50}$(95%FL) | 90%致死浓度(95%置信区间)/mg·L$^{-1}$ $LC_{90}$(95%FL) | 增效倍数(SR) Synergistic ratio |
|---|---|---|---|---|
| IND | 2.32±0.10 | 20.62(19.11～22.25) | 73.57(62.65～86.40) | 1.00 |
| IND+DEM | 1.25±0.21 | 9.21(5.52～15.37) | 98.45(58.61～165.39) | 2.24 |
| IND+PBO | 2.13±0.26 | 10.08(8.01～12.68) | 40.16(30.64～52.62) | 2.05 |
| IND+TPP | 2.02±0.23 | 41.00(34.43～48.82) | 177.18(119.26～263.24) | 0.50 |

1) 增效倍数是茚虫威单剂的 $LC_{50}$ 与茚虫威+增效剂的 $LC_{50}$ 的比值。
Synergistic ratio (SR)=$LC_{50}$ of indoxacarb/$LC_{50}$ of indoxacarb plus DEM, PBO or TPP.

### 2.2 $LC_{20}$ 的茚虫威对解毒酶活性的诱导效应

如图 1 所示，$LC_{20}$ 的茚虫威处理 48 h 后，GSTs 的活性和 MFO 的含量被显著诱导增加，但 CarE 的活性与空白对照无显著差异($P>0.05$)。




图中数据为平均值±标准误。柱上不同小写字母表示$LC_{20}$处理和CK之间差异显著($P<0.05$, *t*-检验)
Data are presented as mean±SE. Different small letters above bars indicate significant difference between $LC_{20}$ and CK ($P<0.05$, *t*-test)

**图 1 $LC_{20}$ 茚虫威处理 48 h 对草地贪夜蛾 3 龄幼虫解毒酶的影响**

**Fig. 1 Effect of $LC_{20}$ of indoxacarb on detoxifying enzymes in the 3rd instar larvae of *Spodoptera frugiperda* after treatment for 48 h**

## 3 讨论

Yu 等[17]研究表明对甲萘威(626～1 159 倍)和对硫磷(30～39 倍)等产生高水平或中等水平抗性的田间草地贪夜蛾与茚虫威不存在交互抗性。对氯菊酯产生高水平抗性(987 倍)的小菜蛾对茚虫威也未表现出交互抗性，这表明茚虫威是治理抗药性害虫的良好药剂。但也有研究报道三嗪类除草剂如莠去津和莠灭净等可诱导草地贪夜蛾解毒酶活性增强导致对茚虫威的敏感性降低[18]，表明害虫自身的解毒酶系统受周围环境的影响，进而影响杀虫剂的杀虫效果。目前国外有关茚虫威在草地贪夜蛾防治中的研究仅限于敏感性或交互抗性等方面[17-18]。有关害虫对茚虫威抗性机制的研究多集中在小菜蛾、甜

菜夜蛾和斜纹夜蛾等其他鳞翅目害虫[19-22]，而针对草地贪夜蛾对茚虫威的抗性机制研究比较缺乏。茚虫威对入侵我国广西南宁的草地贪夜蛾 3 龄幼虫 48 h 的 $LC_{50}$ 为 20.62 mg/L，以 30%的茚虫威悬浮剂为例，其用量为 6～8 mL/667 $m^2$（30 L 水），田间推荐剂量为 60～80 mg/L，其 $LC_{90}$（73.57 mg/L）尚低于我国登记的茚虫威田间推荐剂量，加之茚虫威持效期长达 14 d 左右。说明茚虫威可以作为防治草地贪夜蛾的药剂在广西田间使用。然而尹艳琼等[8]研究表明 30%茚虫威 SC 对云南 5 个地区草地贪夜蛾的 $LC_{50}$ 虽介于 23.79～40.41 mg/L 之间，但其 $LC_{90}$ 多已经超出田间推荐剂量。因此在广西应加强草地贪夜蛾对茚虫威抗性的监测，同时将茚虫威与有效增效剂配合使用，以减缓茚虫威抗性的发展。

3 种增效剂的增效结果表明 PBO 和 DEM 对茚虫威具有较强的增效作用，增效倍数分别为 2.05 和 2.24 倍，尤其是 PBO 使得茚虫威对草地贪夜蛾的 $LC_{90}$ 降低至 40.16 mg/L。但 TPP 对茚虫威并无明显增效作用。同时 $LC_{20}$ 的茚虫威处理草地贪夜蛾 3 龄幼虫 48 h 对其 MFO 含量和 GSTs 活性具有显著的诱导增加的作用，而对羧酸酯酶活性无显著影响，这与增效剂试验结果一致。本研究结果初步表明草地贪夜蛾的 MFO 和 GSTs 可能参与对茚虫威的解毒代谢。这一结果与其他鳞翅目害虫如小菜蛾、斜纹夜蛾等对茚虫威的抗性机制研究结果一致[19-22]。

本试验结果提示，广西草地贪夜蛾仍可以用推荐剂量的茚虫威防治。由于 PBO 和 DEM 对茚虫威有明显的增效作用，且茚虫威对 MFO 含量和 GSTs 活性具有显著的诱导增加作用，初步推测这两种解毒酶可能影响将来草地贪夜蛾对茚虫威的抗药性发展。

## 参考文献


[1] 王芹芹，崔丽，王立，等. 草地贪夜蛾对杀虫剂的抗性研究进展[J]. 农药学学报，2019，21(4)：401－408.

[2] 崔丽，芮昌辉，李永平，等. 国外草地贪夜蛾化学防治技术的研究与应用[J]. 植物保护，2019，45(4)：7－13.

[3] 佚名. 农业农村部公布草地贪夜蛾应急防治用药名单[J]. 科学种养，2019(9)：4.

[4] 李富根，艾国民，李友顺，等. 茚虫威的作用机制与抗性研究进展[J]. 农药，2013，52(8)：558－560.

[5] 冯青，赖柯华，黄伟康，等. 茚虫威对斑马鱼的急性毒性及遗传毒性[J]. 生态毒理学报，2015，10(4)：226－234.

[6] 沈娟，付群梅，唐庆红，等. 茚虫威改造物 SIOC-Y-047 室内生物活性及作用特性评价[J]. 农药，2015，54(1)：625－627.

[7] 王芹芹，崔丽，王奇渊，等. 茚虫威亚致死浓度对茚虫威敏感性降低的棉铃虫生物学参数及解毒酶活性的影响[J]. 昆虫学报，2019，62(8)：960－969.

[8] 尹艳琼，张红梅，李永川，等. 8 种杀虫剂对云南不同区域草地贪夜蛾种群的室内毒力测定[J]. 植物保护，2019，45(6)：70－74.

[9] 赵胜园，孙小旭，张浩文，等. 常用化学杀虫剂对草地贪夜蛾防效的室内测定[J]. 植物保护，2019，45(3)：10－14.

[10] LI Xianchun, SCHULER M A, BERENBAUM M R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics [J]. Annual Review of Entomology, 2007, 52: 231－253.

[11] ZHANG H, TANG T, CHENG Y, et al. Cloning and expression of cytochrome P450 CYP6B7 in fenvalerate-resistant and susceptible *Helicoverpa armigera* (Hübner) from China [J]. Journal of Applied Entomology, 2010, 134(9/10): 754－761.

[12] 慕立义. 植物化学保护研究方法[M]. 北京：中国农业出版社，1994：222－240.

[13] 梁沛，高希武，郑炳宗，等. 小菜蛾对阿维菌素的抗性机制及交互抗性研究[J]. 农药学学报，2001，3(1)：41－45.

[14] 王芹芹，崔丽，王奇渊，等. 棉铃虫对茚虫威的抗性机理：PBO，DEF 和 DEM 的增效作用及解毒酶活性[J]. 昆虫学报，2017，60(8)：912－919.

[15] 王芹芹，崔丽，王立，等. 草地贪夜蛾对小麦的为害风险：取食为害性及解毒酶活性变化初探[J/OL]. 植物保护：1－8 [2019－10－17]. https://doi.org/10.16688/j.zwbh.2019508.

[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] YU S J, MCCORD E. Lack of cross-resistance to indoxacarb in insecticide-resistant *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae) [J]. Pest Management Science, 2007, 63(1): 63－67.

[18] YU S J. Induction of detoxification enzymes by triazine herbicides in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2004, 80(2): 113－122.

[19] SAYYED A H, WRIGHT D J. Genetics and evidence for an esterase-associated mechanism of resistance to indoxacarb in a field population of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) [J]. Pest Management Science, 2006, 62(11): 1045－1051.

[20] GAO Ming, MU Wei, WANG Wei, et al. Resistance mechanisms and risk assessment regarding indoxacarb in the beet armyworm, *Spodoptera exigua* [J]. Phytoparasitica, 2014, 42(5): 585－594.

[21] 刘辉，肖鹏，刘永杰，等. 斜纹夜蛾对茚虫威抗性风险分析及抗性生化机理[J]. 农药，2011，50(3)：197－200.

[22] RAMYA S L, VENKATESAN T, SRINIVASA M K, et al. Detection of carboxylesterase and esterase activity in culturable gut bacterial flora isolated from diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus), from India and its possible role in indoxacarb degradation[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2016, 47(2): 327－336.


（责任编辑：杨明丽）