

橘小实蝇对甲氨基阿维菌素苯甲酸盐的抗性机制 及对其他药剂的交互抗性

王 敏¹, 王新溪¹, 王圣印^{2*}

(1. 浙江省金华市永康市农业技术推广中心, 金华 321300; 2. 浙江农林大学现代农学院, 杭州 311300)

摘要 入侵害虫橘小实蝇严重为害蔬菜、花卉、水果等经济作物, 目前在田间常使用杀虫剂进行防治。为探索甲氨基阿维菌素苯甲酸盐(甲维盐)防控橘小实蝇的抗性风险, 采用药膜法测定了橘小实蝇抗甲维盐种群(EB)对8种杀虫剂的交互抗性水平, 并测定了橘小实蝇EB种群、金华田间种群(JH)和敏感种群(S)的解毒酶活性。历经33代筛选, 橘小实蝇EB种群对甲维盐产生了43.4倍的中等水平抗性, 对阿维菌素存在中等水平交互抗性, 对吡虫啉、辛硫磷、马拉硫磷存在低水平交互抗性, 对噻虫胺、高效氯氟氰菊酯、多杀霉素和虫螨腈未表现出交互抗性。胡椒基丁醚(PBO)、磷酸三苯酯(TPP)和顺丁烯二酸二乙酯(DEM)均可显著提高甲维盐对橘小实蝇EB种群、JH种群和S种群的室内毒力。橘小实蝇EB种群细胞色素P450(3.9倍)和 b_5 含量(3.3倍)、O-脱甲基酶活性(4.2倍)、谷胱甘肽S-转移酶活性(2.7倍)、羧酸酯酶活性(3.2倍)显著高于S种群。多功能氧化酶、谷胱甘肽S-转移酶、羧酸酯酶活性显著增强可能是橘小实蝇对甲维盐产生高水平抗性的重要机制。

关键词 橘小实蝇; 甲维盐; 多杀霉素; 虫螨腈; 交互抗性; 抗性机制

中图分类号: S 481.4 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2021586

Resistance mechanisms of *Bactrocera dorsalis* population to emamectin benzoate and its cross-resistance to other insecticides

WANG Min¹, WANG Xinxi¹, WANG Shengyin^{2*}

(1. Agricultural Technology Extension Center of Yongkang, Jinhua, Zhejiang Province, Jinhua 321300, China;

2. College of Advanced Agricultural and Science, Zhejiang A & F University, Hangzhou 311300, China)

Abstract *Bactrocera dorsalis* is a destructive quarantine pest of vegetables, flowers and fruits, and insecticides are often used to control this pest in the field. In order to explore the resistance risk, the cross resistance to eight insecticides was investigated using the method of drug film in the glass tube. In addition, the biochemical resistance mechanism of the resistant population (EB), Jinhua field population (JH) and susceptible population (S) of *B. dorsalis* were also studied. After selecting for 33 generations, *B. dorsalis* showed a medium level of resistance to emamectin benzoate (43.4-fold). The results showed that the EB population had a medium level of cross-resistance to abamectin, and a low level of cross-resistance to imidacloprid, phoxim and malathion, but no cross-resistance to clothianidin, lambda-cyhalothrin, spinosad and chlorfenapyr. All of the synergists, including piperonyl butoxide (PBO), triphenyl phosphate (TPP) and diethyl maleate (DEM), had a significant synergistic effect on emamectin benzoate in killing the EB, JH and S populations. Compared to the S population, the activities of mixed-function oxidases P450 (3.9-fold), b_5 (3.3-fold) and O-demethylase (4.2-fold), glutathione S-transferases (2.7-fold) and carboxylesterase (3.2-fold) increased significantly in the EB population. The results indicated that the increased mixed-function oxidases, glutathione S-transferases and carboxylesterase might play an important role in the resistance of *B. dorsalis* to emamectin benzoate.

Key words *Bactrocera dorsalis*; emamectin benzoate; spinosad; chlorfenapyr; cross-resistance; resistance mechanism

收稿日期: 2021-10-24 修订日期: 2022-01-20

基金项目: 国家自然科学基金(31701848)

* 通信作者 E-mail: wm20002021@163.com

橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 又名橘子蛆、果蛆、黄苍蝇、柑橘小实蝇和东方果实蝇等,广泛分布于中国华东、华南、华中和云贵地区^[1-2]。橘小实蝇寄主范围较广,目前发现其寄主包括花卉、水果、蔬菜共 76 个科 211 个属 627 种,适宜寄主种类数量高达 478 种^[3]。橘小实蝇成虫羽化后需经历长时间补充营养,卵巢发育成熟后才能交配^[4],其雌成虫使用外生殖器刺破柑橘果皮,在果皮内产卵,每处产卵数量 5~10 粒不等^[5]。卵期 1~6 d,孵化后幼虫在果肉内为害,常导致柑橘被害果提前脱落,果肉腐烂失去经济价值^[6-7]。目前橘小实蝇是重要的危险性国际检疫害虫,也是我国的检疫对象^[8-9]。

橘小实蝇形态特征、分类地位、生活习性、发生规律和综合防治措施是目前的主要研究内容,由于杀虫剂广泛使用,关于橘小实蝇田间种群抗性的研究报道也逐渐增加^[10-13]。橘小实蝇在我国华南、华中、华东和云贵地区为害猖獗,导致上述地区橘小实蝇抗药性发展迅速。陈朗杰等的研究发现,在深圳周边地区,橘小实蝇对生物源杀虫剂阿维菌素和菊酯类杀虫剂氯氟氰菊酯和高效氯氟菊酯产生了 16.59~18.95 倍的中等水平抗性,对广谱性杀虫剂敌百虫、辛硫磷、毒死蜱与灭多威产生了低水平抗性,但对生物源杀虫剂甲氨基阿维菌素苯甲酸盐(以下简称甲维盐)和多杀霉素仍处于敏感状态^[14]。何凤梅等的研究发现,广西不同地区橘小实蝇抗性发展水平差异较大,玉林和百色等 4 个地市橘小实蝇田间种群均对氯氟菊酯产生了中等水平抗性,对阿维菌素形成中等抗性的橘小实蝇仅发现于桂林和玉林两市^[15]。为探索高频使用甲维盐防治橘小实蝇是否存在抗性风险,通过室内连续筛选 33 代获得了橘小实蝇抗甲维盐种群(43.4 倍),测定了抗甲维盐橘小实蝇种群与常用菊酯类杀虫剂高效氯氟氰菊酯、新烟碱类杀虫剂吡虫啉和噻虫胺、有机磷类杀虫剂辛硫磷和毒死蜱、生物源杀虫剂阿维菌素和多杀霉素、新型杂环杀虫剂虫螨腈的交互抗性水平,并探索了橘小实蝇对甲维盐的生化抗性机制。

1 材料与方法

1.1 供试杀虫剂和试剂

供试杀虫剂均为原药:99%甲维盐、99%阿维菌素和 98%吡虫啉购于贵州利兴药业有限公司;99%

辛硫磷、99%毒死蜱、99%噻虫胺、99%高效氯氟氰菊酯和 99%多杀霉素购于合肥诺尔达生物科技有限公司;98%虫螨腈购于陕西惠诚生物科技有限公司。

主要试剂:98%毒扁豆碱、98%乙二胺四乙酸(EDTA)、98%牛血清白蛋白(BSA)与 99%十二烷基磺酸钠(SDS)购于 Sigma 公司;70%考马斯亮蓝 G250 与 99%还原型谷胱甘肽(GSH)购于 Fluka 公司;96% α -乙酸萘酯(α -NA)购于 Aladdin 公司。增效剂 95%胡椒基丁醚(PBO)购于湖北汉达飞生物科技有限公司;98%磷酸三苯酯(TPP)购于山东国化化学有限公司;97%顺丁烯二酸二乙酯(DEM)购于上海昆森实业有限公司。其他试剂为国产分析纯或化学纯。

1.2 供试虫源

相对敏感种群(S):采自浙江省金华市武义县履坦镇汤村。在果园内采集带虫柑橘落果,带回实验室内以柑橘饲喂。将虫果放置在铺有 5 cm 河沙的塑料盆中,果内老熟幼虫脱果进入河沙内化蛹。收集橘小实蝇成虫放置于 20 目纱笼内(60 cm×60 cm×60 cm),为其提供蜂蜜水(3%)补充营养,使用柑橘诱集产卵。室内饲养 10 代,期间不接触任何杀虫剂,建立相对敏感种群,收集 2 日龄成虫作为供试虫源。

金华田间种群(JH):采自浙江省金华市永康市花街镇八字墙村,虫果带回室内后参照敏感种群饲养。收集 F₂ 代的 2 日龄成虫供试。

甲维盐抗性种群(EB):将甲维盐原药使用丙酮配制成母液,根据橘小实蝇抗性发展速度,按照每次筛选杀死约 50%成虫的剂量在蜂蜜水中加入甲维盐母液。收集敏感种群 2 日龄成虫约 1 000 头作为供试虫源封闭于纱笼内,饥饿处理 2 h 后,在纱笼内放入甲维盐蜂蜜水,橘小实蝇取食 1 h 后取出甲维盐蜂蜜水,使用无杀虫剂的柑橘继续饲养。筛选 33 代后,抗性种群的抗性倍数为 43.4 倍。收集抗性种群 2 日龄成虫供试。饲养环境条件为(25±0.5)℃,光周期 L//D=14 h//10 h,RH(65±5)%。

1.3 生物测定

橘小实蝇生物测定采用玻璃管药膜法^[10,14]。将供试杀虫剂原药使用丙酮配制成母液,根据预试验测定结果,将杀虫剂母液用丙酮稀释成 5~7 个浓度。抽取 10 mL 稀释后的药液,注入玻璃管中(直

径 5 cm, 长 15 cm), 摇动玻璃管使药液均匀涂布, 倒掉多余的药液, 静置玻璃管至内壁药液风干。将 20~25 头橘小实蝇 2 日龄成虫引入涂布药膜的玻璃管, 放置 3% 蜂蜜水浸透的棉球供成虫取食, 用纱布封闭玻璃管口。24 h 后观察玻璃管内橘小实蝇成虫的存活数量, 以毛笔轻触虫体不能正常爬行作为标准判定为死亡。对照组为丙酮水溶液, 有效试验中对照组死亡率必须低于 10%。处理和对照组均重复 3 次。

增效剂生物测定: 首先将增效剂胡椒基丁醚 (PBO)、磷酸三苯酯 (TPP) 和顺丁烯二酸二乙酯 (DEM) 使用丙酮配制成母液 (10 g/L)^[16]。然后根据预试验结果, 将供试杀虫剂稀释成 5~8 个浓度, 药液体积除以 100 为增效剂母液的体积。将增效剂母液加入药液, 可使增效剂在所有药液中的浓度一致 (100 mg/L)。其他操作与上述生物测定方法相同。每浓度重复 3 次。

1.4 酶活性测定

1.4.1 细胞色素 P450 含量测定

参考 Lee 等^[17]的方法收集橘小实蝇 2 日龄雌成虫 5 头, 置于匀浆缓冲液 (0.1 mol/L pH 7.5 磷酸钠缓冲液, 含 1 mmol/L EDTA、0.1 mmol/L DTT、1 mmol/L PTU、1 mmol/L PMSF 和 10% 甘油) 中匀浆, 操作全程冰浴。4℃, 10 000 g 离心 15 min。过滤上清液后, 4℃, 10 000 g 下离心 1 h, 将微粒体沉淀在重悬浮缓冲液 (0.1 mol/L pH 7.5 磷酸钠缓冲液、1 mmol/L EDTA、0.1 mol/L DTT、1 mmol/L PMSF 和 20% 甘油) 中重悬浮作酶源。重复 3 次提取酶原。

参考 Omura 等^[18]CO 差示光谱法测定多功能氧化酶 (MFO) 和细胞色素 P450 含量。将微粒体悬浮液用重悬缓冲液稀释至 1 mg/mL 左右, 加入连二亚硫酸钠颗粒至饱和, 平衡 5 min, 一分为二, 分别加入参比杯和样品杯中。使用紫外可见分光光度计在波长 400~500 nm 处扫描, 以参比杯为空白, 扫描样品杯的光吸收值为基线。待基线稳定平直时在样品杯中通 CO, 以参比杯为空白, 扫描样品杯的光吸收值, 记录 OD₄₅₀、OD₄₉₀、OD₄₂₆ 和 OD₄₀₉, 按下式分别计算 P450 和细胞色素 b₅ 含量。每次提取酶液重复测定 3 次。

P450 含量 = $(OD_{450} - OD_{490}) / (\text{消光系数} \times \text{蛋白含量})$, 其中消光系数为 91 mmol · L⁻¹ · cm⁻¹;

细胞色素 b₅ 含量 = $(OD_{426} - OD_{409}) / (\text{消光系数} \times \text{蛋白含量})$, 其中消光系数为 185 mmol · L⁻¹ · cm⁻¹。

1.4.2 细胞色素 P450 O-脱甲基酶活性测定

参考 Hansen 等^[19]测定多功能氧化酶 (MFO) O-脱甲基酶活性。反应总体积 2 mL: 1 270 μL 0.1 mol/L pH 7.8 的磷酸缓冲液, 200 μL 0.36 mmol/L NADPH, 30 μL 3 mmol/L 对-硝基苯甲醚, 500 μL 酶液。反应体系在 25℃ 振荡温育反应 30 min, 加入 0.5 mL 1 mol/L HCl 终止反应, 再加入 2.5 mL 三氯甲烷萃取反应产物对-硝基酚, 3 000 g 离心 15 min。取下层即三氯甲烷层 1.5 mL 加入 1.5 mL 0.5 mol/L NaOH 反萃取。NaOH 萃取液使用分光光度计在 400 nm 测定 OD 值, 以 0.5 mol/L NaOH 溶液为对照。以对-硝基酚标准曲线和酶液中的蛋白质含量求出每分钟每毫克蛋白催化产生的对-硝基酚的摩尔数来表示酶的活性。重复 3 次提取酶液, 每次提取酶液重复测定 3 次。

1.4.3 羧酸酯酶活力测定

参照 Van Asperen^[20]的方法测定橘小实蝇 CarE 活力。取 5 头橘小实蝇 2 日龄雌成虫在液氮中冷冻后立刻加入 0.04 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 2 mL, 在冰浴条件下迅速充分匀浆, 匀浆液于 4℃、10 000 r/min 离心 10 min, 分离上清液即为酶液, 冰浴待用。以 5 mL α-乙酸萘酯 (3 × 10⁻⁴ mol/L) 为底物, 加入 0.2 mL 酶液, 在 37℃ 条件下恒温水浴振荡 30 min, 加入 1 mL DBLS (1% 坚固蓝 B 盐溶液: 5% 十二烷基硫酸钠水溶液 = 2: 5) 终止反应, 将混合液置于室温显色 30 min, 使用分光光度计测定 600 nm 处 OD 值。对照组以 0.2 mL 磷酸缓冲液代替酶液。根据 α-萘酚标准曲线计算出每毫升酶生成的 α-萘酚量。测定酶源蛋白质含量 (mg · mL⁻¹), 计算出羧酸酯酶的比活力 (nmol · min⁻¹ · mg⁻¹)。重复 3 次提取酶液, 每次提取酶液重复测定 3 次。

1.4.4 谷胱甘肽 S-转移酶活力测定

参照 Wu 等^[21]的方法测定 GST 的比活力。取 5 头橘小实蝇 2 日龄雌成虫在液氮中冷冻后立刻加入 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 2 mL 在冰浴条件下迅速充分匀浆, 匀浆液于 4℃、10 000 r/min 离心 10 min, 分离上清液即为酶液, 冰浴待用。以 CDNB 为底物, 在试管中依次加入 66 mmol/L 磷酸缓冲液 2.4 mL, 50 mmol/L 谷胱甘肽 0.3 mL, 0.03 mol/L

CDNB 0.1 mL,酶液 0.2 mL,立即混匀,在 27℃水浴条件下反应 5 min,使用分光光度计在 340 nm 下测 OD 值。对照组以 0.2 mL 磷酸缓冲液代替酶液。酶源经蛋白质含量测定,计算出谷胱甘肽 S-转移酶的比活力($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)。重复 3 次提取酶液,每次提取酶液重复测定 3 次。

1.4.5 蛋白总量测定

酶源蛋白质含量采用考马斯亮蓝 G-250 染色后测定^[22]。吸取 0.3 mL 酶液于 10 mL 试管中,空白对照以 0.3 mL 磷酸缓冲液代替,加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 试剂,充分混匀于 25℃恒温水浴染色 2 min,水浴后 5 min 内在 595 nm 下比色测 OD 值。根据牛血清白蛋白标准曲线计算出蛋白质含量,除以 0.3 即每毫升酶液中的蛋白含量($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。重复 3 次提取酶液,每次提取酶液重复

测定 3 次。

1.5 数据处理

橘小实蝇交互抗性与增效剂生物测定数据使用 Polo Plus 1.0 软件分析,计算毒力回归曲线斜率、致死中浓度(LC_{50})和 95%置信区间^[23]。酶活性测定数据使用 SPSS 22.0 软件进行分析,用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 交互抗性

橘小实蝇 EB 种群与阿维菌素存在中等水平交互抗性($\text{RR}_{50}=20.7$),与吡虫啉、辛硫磷和马拉硫磷存在低水平交互抗性($5<\text{RR}_{50}\leq 10$),与噻虫胺、高效氯氟氰菊酯、多杀霉素和虫螨腈未表现出交互抗性($\text{RR}_{50}<5$)(表 1)。

表 1 橘小实蝇抗甲维盐种群对 8 种杀虫剂的交互抗性水平¹⁾

Table 1 The level of cross-resistance of *Bactrocera dorsalis* EB population to eight insecticides

药剂 Insecticide	种群 Population	斜率±标准误 Slope ±SE	LC ₅₀ (95%置信区间)/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LC ₅₀ (95% CI)	df	χ^2	抗性倍数 RR ₅₀
甲氨基阿维菌素苯甲酸盐	EB	2.01±0.20	36.69(30.65~43.57)	13	7.97	43.4
emamectin benzoate	S	1.96±0.20	0.85 (0.70~1.07)	13	9.42	
阿维菌素	EB	2.44±0.22	59.61 (51.28~69.42)	13	7.60	20.7
abamectin	S	2.31±0.22	2.89 (2.48~3.36)	13	3.85	
吡虫啉	EB	2.27±0.21	38.99 (33.22~45.68)	13	4.57	7.4
imidacloprid	S	2.08±0.20	5.26 (4.44~6.23)	13	8.55	
辛硫磷	EB	2.36±0.22	124.26 (106.32~145.26)	13	3.01	7.6
phoxim	S	2.33±0.22	16.41(14.09~19.19)	13	8.52	
马拉硫磷	EB	1.72±0.17	31.07 (26.58~36.32)	13	3.51	5.7
malathion	S	2.76±0.24	5.47 (4.69~6.39)	13	8.52	
噻虫胺	EB	2.67±0.30	39.38 (33.81~46.06)	13	3.97	4.8
clothianidin	S	2.44±0.22	8.28 (7.09~9.68)	13	8.52	
高效氯氟氰菊酯	EB	2.29±0.21	71.60 (61.28~83.83)	13	10.67	4.7
lambda-cyhalothrin	S	2.17±0.21	15.40 (13.05~18.12)	13	6.50	
多杀霉素	EB	2.32±0.21	0.98 (0.84~1.15)	13	4.69	1.8
spinosad	S	2.15±0.20	0.55 (0.47~0.65)	13	3.95	
虫螨腈	EB	1.78±0.19	62.13 (53.16~72.63)	13	7.05	1.4
chlorfenapyr	S	2.63±0.29	43.75 (37.57~51.18)	13	8.52	

1) EB: 抗甲维盐种群; S: 敏感种群。下同。抗性倍数=抗性种群的 LC_{50} /敏感种群的 LC_{50} 。
EB; Population resistant to emamectin benzoate; S; Susceptible population. The same applies below. Resistance ratio (RR_{50})= LC_{50} (EB)/ LC_{50} (S).

2.2 3 种增效剂对甲维盐的增效作用

增效剂生物测定结果表明(表 2),PBO 对橘小实蝇 EB 种群、S 种群和 JH 种群均有显著增效作用,增效倍数分别为 3.4、2.9 倍和 3.3 倍;TPP 对

橘小实蝇 EB 种群、S 群和 JH 种群均有显著增效作用,增效倍数分别为 2.5、2.0 倍和 2.5 倍;DEM 对橘小实蝇 EB 种群、S 种群和 JH 种群也具有显著增效功能,增效倍数分别为 1.7、1.4 倍和 1.6 倍。

表 2 增效剂 PBO,TPP 和 DEM 对甲维盐的增效作用¹⁾

Table 2 Synergistic effect of PBO, TPP and DEM on emamectin benzoate

种群 Population	处理 Treatment	斜率±标准误 Slope±SE	LC ₅₀ (95%置信区间)/mg·L ⁻¹ LC ₅₀ (95% CI)	df	χ ²	增效倍数 SR ₅₀
EB	甲维盐 emamectin benzoate	2.84±0.26	36.69 (30.65~43.57)	13	7.97	—
	甲维盐 emamectin benzoate+PBO	2.61±0.22	10.93 (9.23~12.82)	13	6.95	3.4*
	甲维盐 emamectin benzoate+TPP	2.15±0.20	14.57 (12.30~17.10)	13	7.32	2.5*
	甲维盐 emamectin benzoate+DEM	1.94±0.19	21.48 (18.23~25.21)	13	5.47	1.7*
S	甲维盐 emamectin benzoate	2.11±0.21	0.85 (0.70~1.01)	13	9.42	—
	甲维盐 emamectin benzoate+PBO	2.08±0.23	0.29 (0.21~0.36)	13	8.23	2.9*
	甲维盐 emamectin benzoate+TPP	1.75±0.18	0.42 (0.35~0.50)	13	5.91	2.0*
	甲维盐 emamectin benzoate+DEM	2.35±0.24	0.59 (0.49~0.71)	13	6.68	1.4*
JH	甲维盐 emamectin benzoate	2.25±0.19	8.95 (7.59~10.50)	13	7.52	—
	甲维盐 emamectin benzoate+PBO	1.63±0.17	2.69 (2.28~3.15)	13	8.17	3.3*
	甲维盐 emamectin benzoate+TPP	1.89±0.19	3.58 (3.04~4.20)	13	6.59	2.5*
	甲维盐 emamectin benzoate+DEM	2.21±0.21	5.47 (4.56~6.30)	13	8.11	1.6*

1) JH: 金华田间种群。下同。星号表示添加增效剂前后的 LC₅₀具有显著性差异($P<0.05$)。
JH: Field population from Jinhua. The same below. Asterisk indicates significant difference between LC₅₀ before and after the addition of synergist ($P<0.05$).

2.3 酶活性比较

酶活性测定结果表明(表 3),橘小实蝇 EB 种群和 JH 种群的细胞色素 P450(3.9 倍和 3.1 倍)和 b₅ 含量(3.3 倍和 1.3 倍)、O-脱甲基酶活性(4.2 倍和

1.5 倍)均较敏感种群 S 交显著提高。
橘小实蝇 EB 种群和 JH 种群的谷胱甘肽 S-转
移酶活性(2.7 倍和 1.4 倍)和羧酸酯酶活性(3.2 倍
和 1.9 倍)均显著高于敏感种群(表 4)。

表 3 橘小实蝇不同种群 MFO O-脱甲基酶活性、细胞色素 P450 和 b₅ 含量¹⁾

Table 3 The activity of MROD and the contents of cytochrome P450 and b₅ in *Bactrocera dorsalis* populations

种群 Population	P450 含量/nmol·mg ⁻¹ P450 content		b ₅ 含量/nmol·mg ⁻¹ b ₅ content		O-脱甲基酶活性/pmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ MROD activity	
	平均值±标准误 Mean±SE	倍数 Ratio	平均值±标准误 Mean±SE	倍数 Ratio	平均值±标准误 Mean±SE	倍数 Ratio
EB	(10.19±1.20)a	3.9	(0.63±0.05)a	3.3	(5.69±0.53)a	4.2
JH	(7.94±0.51)b	3.1	(0.24±0.02)b	1.3	(2.08±0.16)b	1.5
S	(2.58±0.24)c	1.0	(0.19±0.02)c	1.0	(1.37±0.15)c	1.0

1) 表中同一列数据具有不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著($P<0.05$)。下同。
Different letters in the same column indicate significant difference (Duncan's test, $P<0.05$) The same applies below.

表 4 橘小实蝇不同种群谷胱甘肽 S-转移酶和羧酸酯酶活性¹⁾

Table 4 The activities of GST and CarE in *Bactrocera dorsalis* populations

种群 Population	谷胱甘肽 S-转移酶活性/nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ GST activity		羧酸酯酶活性/nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ CarE activity	
	平均值±标准误 Mean±SE	倍数 Ratio	平均值±标准误 Mean±SE	倍数 Ratio
EB	(4.60±0.31)a	2.7	(5.22±0.49)a	3.2
JH	(2.09±0.17)b	1.4	(3.18±0.30)b	1.9
S	(1.52±0.13)c	1.0	(1.64±0.18)c	1.0

3 讨论

研究发现,棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、西花
蓟马 *Frankliniella occidentalis*、黏虫 *Mythimna
separata* 等农业害虫经人工选育对甲维盐产生中高
水平抗性之后,常对多种杀虫剂产生不同水平的交

互抗性^[24-26]。人工室内选育出的西花蓟马抗甲维盐
种群可对阿维菌素产生高水平交互抗性(31.7 倍),
对甲维盐具有高抗性水平的黏虫种群也会对阿维菌
素形成中等交互抗性(21.8 倍)^[25]。本研究发现,橘
小实蝇 EB 种群与阿维菌素存在中等水平交互抗
性。综合黏虫、西花蓟马和棉铃虫交互抗性研究结

果推测,同种害虫易对作用机制相同的杀虫剂产生交互抗性。对甲维盐具有高抗性水平的西花蓟马种群可对啉虫脒形成中等交互抗性,对吡虫啉、虫螨腈、氯氟氰菊酯、毒死蜱和灭多威有低水平交互抗性;黏虫高抗甲维盐种群可对毒死蜱和灭多威形成中等交互抗性,与辛硫磷和氯氟氰菊酯之间交互抗性水平较低;西花蓟马和黏虫抗性种群的多功能氧化酶、羧酸酯酶和谷胱甘肽 S-转移酶等生化解毒酶活性均显著增强^[25-26]。在本研究中,橘小实蝇 EB 种群对吡虫啉、马拉硫磷、辛硫磷、高效氯氟氰菊酯、噻虫胺表现出低水平交互抗性,推测橘小实蝇 EB 种群代谢解毒酶活性升高可能是形成上述低水平交互抗性的重要生化机制。橘小实蝇 EB 种群对噻虫胺、高效氯氟氰菊酯、多杀霉素和虫螨腈未表现出交互抗性,因此推荐甲维盐与噻虫胺、高效氯氟氰菊酯、多杀霉素和虫螨腈在田间轮换使用,对于甲维盐与吡虫啉、辛硫磷和马拉硫磷轮用应持谨慎态度,禁止甲维盐与阿维菌素轮用。

多项研究表明,多种农林害虫对甲维盐的抗性 with 多功能氧化酶活性增强相关^[27-29]。王圣印等^[25]的研究发现,多功能氧化酶抑制剂增效醚(PBO)可显著降低甲维盐对西花蓟马的致死中浓度,对甲维盐具有高抗性水平的西花蓟马种群多功能氧化酶活性显著高于敏感种群。宋月芹等^[26]的研究表明,PBO 可显著提高甲维盐对黏虫的毒力,黏虫对甲维盐产生高水平抗性时,其多功能氧化酶活性亦同步显著上升。侍甜等^[30]的研究表明,多功能氧化酶抑制剂增效醚(PBO)可显著提高甲维盐对甜菜夜蛾田间种群的毒力,酶活性测定结果也表明其多功能氧化酶活性比敏感种群高出 1.7~7.4 倍。在本研究中,PBO 可显著提高甲维盐对橘小实蝇的室内毒力,橘小实蝇 EB 种群的 O-脱甲基酶活性显著升高,细胞色素 P450 和 b₅ 含量也显著增高。由上述研究结果推测,多功能氧化酶活性提高可能是橘小实蝇经室内筛选对甲维盐产生高水平抗性的主要生化机制。

羧酸酯酶抑制剂磷酸三苯酯(TPP)常用于间接探索昆虫羧酸酯酶活性与抗药性的关系^[31-33]。王圣印等^[25]的研究发现,TPP 可显著降低甲维盐对西花蓟马高抗甲维盐种群和敏感种群的致死中浓度,西花蓟马对甲维盐产生高水平抗性后,其羧酸酯酶活性也显著增高。对黏虫高抗甲维盐种群和敏感种群进行室内毒力测定时,TPP 可显著降低甲维盐对上述两个种群的致死中浓度,抗甲维盐种群的羧酸酯酶

活性也显著升高到 1.64 倍^[26]。侍甜等^[30]的研究表明,在使用甲维盐对甜菜夜蛾进行室内生物测定时,酯酶抑制剂 DEF 对甲维盐的增效倍数最高可达 7.7 倍,其羧酸酯酶活性可上升至敏感种群的 4.7 倍。本研究中,橘小实蝇 EB 种群的羧酸酯酶活性显著增强,而 TPP 可显著降低甲维盐对橘小实蝇 EB、JH 和 S 种群的致死中浓度。综上所述,羧酸酯酶活性增强可能是橘小实蝇对甲维盐抗性提高的重要因素。

在增效剂生物测定试验中,顺丁烯二酸二乙酯(DEM)常用于间接探索昆虫谷胱甘肽 S-转移酶与其抗药性的关系^[34-36]。谷胱甘肽 S-转移酶活性抑制剂 DEM 可显著降低甲维盐对西花蓟马的致死中浓度,西花蓟马对甲维盐的抗性水平上升时,谷胱甘肽 S-转移酶活性也随之显著提升^[25]。DEM 可显著提升甲维盐对黏虫的室内毒性,当黏虫对甲维盐产生高水平抗性时,抗性种群的谷胱甘肽 S-转移酶活性显著上升^[26]。本研究中,室内汰选得到的橘小实蝇 EB 种群谷胱甘肽 S-转移酶活性显著提高,而 DEM 可显著提高甲维盐对 EB、JH 和 S 等 3 个橘小实蝇种群的室内生物测定毒力,因此,谷胱甘肽 S-转移酶活性增强可能是橘小实蝇对甲维盐抗性水平上升的重要因素之一。

目前对橘小实蝇多进行综合防控,检验检疫是防治橘小实蝇的首要措施,预测预报有助于做好防治准备措施并决定防治时机,农业防治清洁田园可有效减少虫源,物理防治悬挂黄板或诱集液有助于防治橘小实蝇成虫^[37]。在橘小实蝇成虫暴发期,化学防治也是必须采取的措施之一^[37-38]。结合本研究结果,建议合理轮换使用甲维盐、噻虫胺、高效氯氟氰菊酯、虫螨腈和多杀霉素,可有效延长甲维盐、噻虫胺、高效氯氟氰菊酯、虫螨腈和多杀霉素的使用寿命。以甲维盐单剂为基础,通过添加增效剂创新杀虫剂配方与剂型,有助于实现对橘小实蝇抗性治理,提高甲维盐对橘小实蝇的田间防效。

参考文献

- [1] 张迎新,陈冬,张苏芸,等. 桔小实蝇肽聚糖识别蛋白基因 BdPGRP-SB1 的克隆及功能鉴定[J]. 昆虫学报, 2020, 63 (9): 1070 - 1080.
- [2] 高扬,李慧静,陆永跃,等. 桔小实蝇雌成虫对寄主挥发物 β -石竹烯的行为反应[J]. 环境昆虫学报, 2021, 43(1): 253 - 259.
- [3] MCQUATE G T, SYLVA C D, LIQUIDO N J. Natural field infestation of *Mangifera casturi* and *Mangifera lalijiwa* by oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae)

- [J]. International Journal of Insect Science, 2017, 9: 1-7.
- [4] 袁盛勇, 孔琼, 肖春, 等. 桔小实蝇成虫人工饲料的筛选[J]. 华中农业大学学报, 2006, 25(4): 371-374.
- [5] 胡黎明, 曾玲, 申建梅, 等. 香茅精油对桔小实蝇产卵驱避作用及其化学成份分析[J]. 环境昆虫学报, 2012, 34(2): 249-253.
- [6] 席涵, 刘秀, 舒海娟, 等. 推拉策略在桔小实蝇防治中的研究进展[J]. 农药, 2019, 58(4): 245-249.
- [7] 全金成, 陈贵峰, 江一红, 等. 广西桃李梨桔小实蝇为害调查及其田间防控试验[J]. 中国南方果树, 2019, 48(6): 91-96.
- [8] 杨朗, 黄文九, 黄立飞, 等. 入侵害虫桔小实蝇检测方法的研究发展概况[J]. 农学学报, 2014, 4(1): 19-21.
- [9] 吴广超. 外来入侵有害生物桔小实蝇的风险分析[J]. 林业科技, 2006 (5): 33-35.
- [10] 章玉苹, 曾玲, 陆永跃, 等. 华南地区桔小实蝇抗药性动态监测[J]. 华南农业大学学报, 2007, 28(3): 20-23.
- [11] VARGAS R I, RAMADAN M, HUSSAIN T, et al. Comparative demography of six fruit fly (Diptera: Tephritidae) parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) [J]. Biological Control, 2002, 25(1): 30-40.
- [12] RAMADAN M M. Mass-rearing biology of *Fopius vandenboschi* (Hym. Braconidae) [J]. Journal of Applied Entomology, 2010, 128(3): 226-232.
- [13] ZENIL M, LIEDO P, WILLIAMS T, et al. Reproductive biology of *Fopius arisanus* (Hymenoptera: Braconidae) on *Ceratitis capitata* and *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) [J]. Biological Control, 2004, 29(2): 169-178.
- [14] 陈朗杰, 孟倩倩, 李志强, 等. 深圳地区橘小实蝇田间种群抗药性监测[J]. 中国植保导刊, 2015, 35(6): 63-66.
- [15] 何凤梅, 安长成, 张永魁, 等. 多种药剂对橘小实蝇成虫的毒力测定及田间抗性监测[J]. 植物保护, 2020, 46(5): 270-275.
- [16] 颜改兰, 王圣印. 西花蓟马抗噻虫胺种群对杀虫剂的交互抗性及其机制[J]. 应用生态学报, 2020, 31(10): 3282-3288.
- [17] LEE S S T, SCOTT J G. An improved method for preparation, stabilization and storage of house fly (Diptera: Muscidae) microsomes [J]. Journal of Economic Entomology, 1989, 82(6): 1559-1563.
- [18] OMURA L T, SATO R. The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its heme-protein nature [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1964, 239: 2370-2378.
- [19] HANSEN L G, HODGSON E. Biochemical characteristics of insect microsomes: N- and O-demethylation [J]. Biochemical Pharmacology, 1971, 20(7): 1569-1572.
- [20] VAN ASPEREN K A. Study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method [J]. Journal of Insect Physiology, 1962, 8(4): 401-416.
- [21] WU G, MIYATA T. Susceptibilities to methamidophos and enzymatic characteristics in 18 species of pest insects and their natural enemies in crucifer vegetable crops [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2005, 82(1): 79-93.
- [22] 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(2): 248-254.
- [23] RUSSELL R N, ROBERTSON J L, SAVIN Y N E. Polo: a new computer program for probit analysis [J]. Entomological Society of America, 1977, 23(3): 209-213.
- [24] 董利霞, 芮昌辉, 谭晓伟. 棉铃虫对甲氨基阿维菌素苯甲酸盐的抗性风险及交互抗性研究[C]//吴孔明. 公共植保与绿色防控—中国植物保护学会 2010 年学术年会, 中国农业科学技术出版社, 2010: 912.
- [25] 王圣印, 于毅, 刘永杰. 西花蓟马抗甲氨基阿维菌素苯甲酸盐种群的交互抗性与其生化抗性机制[J]. 植物保护学报, 2012, 39(2): 159-165.
- [26] 宋月芹, 王海涛, 陈玉国, 等. 粘虫抗甲氨基阿维菌素苯甲酸盐种群的交互抗性与其生化抗性机制[J]. 农药学报, 2017, 19(1): 18-24.
- [27] AWAN D A, AHMAD F, SALEEM M A, et al. Synergistic effect of piperonyl butoxide and emamectin benzoate on enzymatic activities in resistant populations of red flour beetle, *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) [J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2019, 26(14): 14200-14213.
- [28] AFZAL M S, SHAD S A. Resistance inheritance and mechanism to emamectin benzoate in *Phenacoccus solenopsis* (Homoptera: Pseudococcidae)[J]. Crop Protection, 2015, 71: 60-65.
- [29] KHAN H, AKRAM W, KHAN T, et al. Risk assessment, cross-resistance potential, and biochemical mechanism of resistance to emamectin benzoate in a field strain of house fly (*Musca domestica* Linnaeus) [J]. Chemosphere, 2016, 151: 133-137.
- [30] 侍甜, 车午男, 吴益东, 等. 甜菜夜蛾田间种群对甲氨基阿维菌素苯甲酸盐和高效氯氰菊酯的代谢抗性机制[J]. 应用昆虫学报, 2012, 49(6): 1482-1489.
- [31] 沈登荣. 增效剂对 4 种杀虫剂防治异迟眼蕈蚊的增效作用[J]. 食用菌学报, 2019, 26(3): 119-124.
- [32] 杨媛雪, 李卓, 段爱玲, 等. 棉花花生间作田中花生蚜对吡虫啉代谢抗性机制初步研究[J]. 棉花学报, 2020, 32(2): 151-157.
- [33] 尚娇, 苏悦, 姚永生, 等. 棉蚜和棉长管蚜增效剂作用及解毒酶活性测定[J]. 农药, 2020, 59(11): 61-64.
- [34] 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.
- [35] 彭梅, 苏文伟, 邓新平. 3 种增效剂对药剂的增效作用及酶的抑制作用[J]. 西南农业大学学报, 2006, 28(3): 475-477.
- [36] 谭建国, 沈晋良, 谭福杰, 等. 几种增效剂对氰戊菊酯穿透速率的影响[J]. 南京农业大学学报, 1992, 15(2): 29-33.
- [37] 欧剑峰, 黄鸿, 吴华, 等. 柑橘小实蝇综合防治概述[J]. 中国植保导刊, 2007, 27(10): 28-29.
- [38] 祁力言, 罗智心, 蒋巧根, 等. 无锡地区橘小实蝇综合防治体系的建立[J]. 江苏农业科学, 2009 (1): 137-138.