

甲氰菊酯亚致死剂量对苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* 解毒酶系的影响

尚素琴, 柳永花, 刘 宁, 张彩虹, 他光崇

(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, 兰州 730070)

摘要:【目的】明确甲氰菊酯对苹果蠹蛾 [*Cydia pomonella* (L.)] 解毒酶系的影响。【方法】采用胃毒法测定甲氰菊酯对苹果蠹蛾 3 龄幼虫的 LC_{10} 和 LC_{20} 。以甲氰菊酯 LC_{10} 和 LC_{20} 质量浓度处理苹果蠹蛾 3 龄幼虫不同时间, 测定其体内多功能氧化酶 (MFOs)、羧酸酯酶 (CarEs) 和谷胱甘肽 S-转移酶 (GSTs) 的活性变化。【结果】 LC_{20} 处理后, CarEs 比活力在 12、24、36、48 h 时为对照的 1.54、2.19、1.53 和 1.34 倍, 6 h 和 60 h 时无明显变化; LC_{10} 处理后, CarEs 比活力在 12、24、36 h 时为对照的 1.40、2.27 和 1.42 倍。 LC_{20} 处理后 GSTs 比活力在 12、24、36 和 48 h 时均显著高于对照和 LC_{10} 处理 ($P < 0.05$); LC_{10} 处理 36 h 和 48 h 时高于对照 ($P < 0.05$), 其余时间均无明显变化。 LC_{20} 处理后, MFOs 比活力在 12、24 和 36 h 时显著高于对照 ($P < 0.05$), 48 h 时显著低于对照 ($P < 0.05$), 其余时间差异不显著; LC_{10} 处理后 12、24 和 36 h 显著高于对照 ($P < 0.05$), 其余时间差异均不显著。 CarEs 的 K_m 在 LC_{20} 处理后 6、12、24、36、48 和 60 h 分别比对照降低了 40.00%、37.23%、32.17%、29.51%、52.94% 和 28.09%, V_{max} 在 6、12 和 48 h 分别比对照升高了 24.59%、19.36% 和 81.97%, 差异显著 ($P < 0.05$); GSTs 的 K_m 值和 V_{max} 变化趋势与 CarEs 相反; MFOs 的 K_m 值在 48 h 显著低于对照 ($P < 0.05$), 其他时间点无明显变化, V_{max} 在 12 和 48 h 时无明显变化, 其余时间点均显著低于对照 ($P < 0.05$)。【结论】 LC_{10} 和 LC_{20} 甲氰菊酯处理后的苹果蠹蛾体内 CarEs、MFOs 和 GSTs 均有解毒作用, 但 CarEs 起主导作用。

关键词: 苹果蠹蛾; 甲氰菊酯; 解毒酶; 亚致死效应; 抗药性

中图分类号: S661.1

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2018)03-0326-08

Effect of sublethal doses of fenprothrin on the activities of detoxification enzymes in *Cydia pomonella*

SHANG Suqin, LIU Yonghua, LIU Ning, ZHANG Caihong, TA Guangchong

(College of Plant Protection of Gansu Agricultural University · Biocontrol Engineering Laboratory of Crop Diseases and Pests of Gansu Province, Lanzhou 730070, Gansu, China)

Abstract: 【Objective】 The use of insecticides to control codling moths *Cydia pomonella* in the apple orchards in China is essential and as a result, the development of insecticide resistance in pest populations is of major concern. *C. pomonella* is one of the main quarantine pests of fruits in apple production and insecticide resistance of this species is little known in a number of countries. The aim of this study is to investigate various detoxification enzymes including multifunctional oxidase (MFO), carboxylesterase (CarE) and glutathione s-transferase (GST) that are involved in *C. pomonella* resistance to fenprothrin by testing the effects of fenprothrin on the activities of detoxifying enzymes in the larvae of *C. pomonella*, and by also observing the impact of the sublethal effects on the survival of individual insects after using fenprothrin which can result in the change in ecological behavior, reproduction and development and so on. 【Methods】 The codling moths were originally collected from abandoned apple orchards in Wuwei city, Gansu province and maintained under standard laboratory conditions of (25 ± 1) °C, a relative humidity of (75 ± 5)%, with a 16:8 light:dark cycle; after which a third of the instar larvae of the codling moths were chosen to be the tested insects. First, prepare the five concentration gradi-

收稿日期: 2017-08-07 接受日期: 2018-01-09

基金项目: 甘肃省省级大学生创新创业训练计划(201610733002)

作者简介: 尚素琴, 女, 博士, 副教授, 主要从事农业昆虫与害虫防治研究。Tel: 18909317206, E-mail: shangsq@gsau.edu.cn

ent 2.5, 5, 10, 20 and 40 mg · L⁻¹ by using raw fenpropathrin and 60% acetone as the solvent, spraying it into the feed block containing 24-holes in which the tested insects were put after being starved for four hours. The LC₅₀ virulence regression equation was established according to the death status of tested insects after being treated for 72 h by using the method of stomach toxicity, of which, different logarithm concentrations of fenpropathrin are set as the abscissa and the mortality probability value of the third instar of *C. pomonella* is set as the ordinate. Then the sublethal doses of LC₁₀ and LC₂₀ of fenpropathrin on the third instar larvae of *C. pomonella* were calculated according to the above equation. The enzyme source proteins of MFOs, CarEs and GSTs were derived from the supernatant of the crude enzyme solution prepared by mixing the collected larvae with 1.5 mL of pre-cooled 0.04 mol · L⁻¹ (pH=7.0) PBS buffer, and 0.1 mol · L⁻¹ (pH=7.8) PBS, 66 mmol · L⁻¹ (pH=7.0) liquid homogenate, centrifuged at 10 000 *g* for 15 min at 4 °C. Then the enzyme activity of the MFOs, CarEs and GSTs of the coding moths was tested respectively after being treated with LC₁₀, LC₂₀ concentrations of fenpropathrin for 6, 12, 24, 36, 48, 60 h. At the same time, the *K_m* and *V_{max}* of these three kinds of detoxification enzymes were calculated by using the Lineweaver-Burk double reciprocal mapping method of Wilkinson's. 【Results】The specific activity of CarEs treated with LC₂₀ were raised 1.54, 2.19, 1.53 and 1.34 times respectively but there were no significant differences at 6 h, 60 h, and that of LC₁₀ enhanced 1.40, 2.27 and 1.42 times at 12 h, 24 h, 36 h respectively in comparison with the control. The specific activity of GSTs treated with LC₂₀ was higher than that of both the control and LC₁₀ treatment (*P* < 0.05), and that of LC₁₀ was higher than that of the control at 36 h and 48 h respectively and showed no significant differences at other times. The specific activity of MFOs treated with LC₂₀ was higher than that of the control at 12 h, 24 h, 36 h and lower at 48 h, and showed no significant differences at other times, and that of LC₁₀ was higher at 12 h, 24 h and 36 h but had no significant differences at other times respectively in comparison with the control. The *K_m* value of CarEs treated with LC₂₀ decreased 40.00%, 37.23%, 32.17%, 29.51%, 52.94% and 28.09% respectively at 6, 12, 24, 36, 48 and 60 h in comparison with the control, and the *V_{max}* values significantly increased 24.59%, 19.36% and 81.97% more than that of the control. The change trend of *K_m* and *V_{max}* of the GSTs is contrary to the CarEs. The *K_m* value of the MFOs was significantly lower than the control at 48 h and had no obvious changes at other times. The *V_{max}* of the MFOs had no obvious changes at 12 h and 48 h but was lower than that of the control at all other times. 【Conclusion】Insecticide resistance is either based on an increase in levels of detoxification enzymes, or is related to reduced target-site sensitivity. Detoxification enzymes that are associated with insecticide resistance belong to large enzyme families. In this study, MFOs and GSTs all played important roles on detoxification after being treated by LC₁₀, LC₂₀ of fenpropathrin on the third instar larvae of *C. pomonella*. of which, the greatest degree decline of *K_m* value and the highest degree of increase of *V_{max}* value were shown with CarEs which indicated that CarEs were the main reason for resistance to fenpropathrin of *C. pomonella*, and also indicated that fenpropathrin played a certain role in the induction of detoxification enzymes of *C. pomonella*. In this study, we investigated the effects of LC₁₀ and LC₂₀ concentrations on the dynamics and kinetic parameters of detoxification enzymes in the third instar larvae of coding moths respectively. It is necessary to select different chemicals to further investigate the changes of detoxification enzymes in different insecticide resistance levels, and then determine the detoxification enzyme activity, and the ultimate screening out of the useful synergist or proper pesticide mix formula so as to provide essential guidance for integrating the management of the resistance population of *C. pomonella* in practice.

Key words: *Cydia pomonella*; Fenpropathrin; Detoxifying enzymes; Sublethal concentration; Resistance

苹果蠹蛾 [*Cydia pomonella* (L.)] 属鳞翅目 (Lepidoptera) 卷蛾科 (Tortricidae) 小卷蛾亚科 (Olethreutinae), 是仁果类果树的毁灭性蛀果害虫, 寄主主要有苹果、梨等。苹果蠹蛾适应性、抗逆性和繁殖能力均很强。该虫以幼虫蛀食果实, 造成大量虫害果, 并导致果实成熟前脱落和腐烂。该虫原产于欧亚大陆, 现已广泛分布于世界各国^[1], 国内主要分布于新疆、甘肃等地^[2-3]。

目前, 对于苹果蠹蛾的防治主要依靠化学防治, 施药后, 杀虫剂将随着时间的推移逐渐递减到亚致死剂量并对存活个体的生态行为、生殖力、生长发育和抗药性的发展等产生一定程度的影响^[4]。但长期大量、频繁地使用杀虫剂, 增大了苹果蠹蛾对药剂的抗性风险^[5-8]。甲氰菊酯是一种拟除虫菊酯类杀虫杀螨剂, 具有触杀、胃毒和一定的驱避作用。属神经毒剂, 作用于昆虫的神经系统, 使昆虫过度兴奋、麻痹而死亡。该药杀虫谱广, 击倒效果快, 持效期长, 对多种害虫和叶螨同时具有良好的防治效果, 特别适合在害虫、害螨并发时使用, 而且对寄主植物一般不造成药害^[9]。

有关昆虫抗药性的研究已有广泛报道, 如沈慧敏^[10]、何玉仙等^[11]报道了苹果黄蚜 (*Aphis citricola*) 和烟粉虱 (*Bemisia tabaci*) 抗甲氰菊酯种群对 13 种杀虫剂产生了交互抗性。Dunley 等^[12]研究了苹果蠹蛾抗谷硫磷种群对二嗪农、亚胺硫磷和 DDT 存在交互抗性; Reyes 等^[13]发现抗谷硫磷苹果蠹蛾种群对甲基阿维菌素、多杀菌素、噻虫啉和毒死蜱存在交互抗性。Bouvier 等^[14]报道了苹果蠹蛾对溴氰菊酯的抗药性。目前, 昆虫对多种农药产生抗性的主要原因是体内 3 种重要的解毒酶 [多功能氧化酶 (MFOs)、羧酸酯酶 (CarEs) 和谷胱甘肽 S-转移酶 (GSTs)] 及其在农药代谢方面的作用^[15], 但关于施用甲氰菊酯后对靶标昆虫及其他非靶标昆虫的影响和抗药性研究鲜有报道。基于此, 笔者采用胃毒法测定甲氰菊酯对苹果蠹蛾 3 龄幼虫的毒力, 并计算 LC_{10} 和 LC_{20} , 测定了 LC_{10} 和 LC_{20} 质量浓度处理后苹果蠹蛾体内 3 种解毒酶 (CarEs、GSTs 和 MFOs) 活性和酶学动力学参数 (K_m 和 V_{max}) 的变化, 旨在探索 LC_{10} 和 LC_{20} 质量浓度的甲氰菊酯对 3 种解毒酶的影响, 以期深入研究苹果蠹蛾的抗药性机制及为甲氰菊酯的合理使用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 供试虫源

供试苹果蠹蛾于 2012 年采自甘肃武威废弃苹果园的蛀果和落果上。在温度 (25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 (75 ± 5)%、光周期 L(光照):D(黑暗)=16 h:8 h 的培养箱内饲养, 羽化后的成虫用 10% (ω) 的蜂蜜水饲养。待成虫交配产卵, 卵孵化出来的幼虫在同一条件下用无毒人工饲料饲养 30 余代, 同时定期采集虫源复壮。所有试虫选个体大小一致的苹果蠹蛾 3 龄幼虫。

1.2 供试药剂和仪器

1.2.1 供试药剂及试剂 98.3% (ω) 甲氰菊酯原药 (青岛海利尔药业有限公司); α -萘酚 (1-naphthol, 国药集团化学试剂有限公司); 固蓝 B 盐 (fast blue b salt, Sigma, 分析纯); 对硝基苯甲醚 (4-nitroanisole, Sigma, 分析纯); 邻苯二酚 (catechol, 中国上海化学试剂公司, 分析纯); 十二烷基磺酸钠 (SDS, Sigma, 化学纯); α -乙酸萘酯 (α -naphthyl acetate, Sigma, 化学纯); 毒扁豆碱 (eserine, Fluka, 纯度 $\geq 98\%$); CDNB (2,4-二氯硝基苯, Sigma, 纯度 $> 99\%$, 化学纯); 还原型谷胱甘肽 (L-glutathione, GSH, 西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司, 纯度 $\geq 98\%$); 牛血清白蛋白 (BSA, Roche); 考马斯亮蓝 G-250 (Coomassie Brilliant G-250, Fluka 分装); 乙二胺四乙酸 (EDTA, 莱阳市双双化工有限公司, 分析纯); NADPH (Sigma, 纯度 $\geq 98\%$) 等。

1.2.2 仪器 泛用高速冷冻离心机 HERMLE Z323K (德国贺默公司)、电子天平 AR224CN (上海奥豪斯仪器有限公司)、酶标仪 ELX800UV (Bio-Tek Instruments)、电热恒温水浴锅 HH-S8 (金坛市医疗仪器厂) 和离子纯水器 KL-UP-I-20 (成都唐氏康宁科技发展有限公司)。

1.3 毒力测定

采用胃毒法: 用 60% (ω) 丙酮水将甲氰菊酯原药配制为 2.5、5、10、20、40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 5 个质量浓度, 然后用移液枪从低到高吸取 10 μL 上述不同质量浓度的甲氰菊酯稀释液分别滴至 24 孔盒中无毒、大小一致的饲料块上, 并接入饥饿处理 4 h 且个体大小均匀的苹果蠹蛾 3 龄幼虫。每个质量浓度处理 100 头, 以丙酮水作对照。处理后的试虫置于温度为 (25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 (75 ± 5)%、光周期 L(光照):D(黑暗)=16 h:8 h 条件饲养。72 h 后统计死亡情况 (用

毛笔轻轻碰触虫体,不动者视为死亡),并计算死亡率,死亡率/%=死虫数/试虫数 \times 100。以甲氰菊酯不同质量浓度的对数为横坐标,以死亡率概率值为纵坐标,求得毒力回归方程,计算甲氰菊酯对苹果蠹蛾的LC₁₀和LC₂₀。

1.4 LC₁₀、LC₂₀质量浓度处理

采用上述方法,用LC₁₀和LC₂₀质量浓度的甲氰菊酯处理苹果蠹蛾3龄幼虫。分别于药剂处理6、12、24、36、48和60 h后用1.5 mL离心管收集存活幼虫,每个处理时间点3次重复,每个重复3头幼虫,并用液氮冷冻后贮存于-20 °C冰箱,待用。

1.5 解毒酶活力测定

1.5.1 酶源蛋白制备和浓度测定 将1.4中收集的幼虫分别用加入1.5 mL预冷的0.04 mol·L⁻¹ PBS缓冲液(pH 7.0)、0.1 mol·L⁻¹ PBS缓冲液(pH 7.8)、66 mmol·L⁻¹ PBS缓冲液匀浆(pH 7.0),4 °C、10 000 g离心15 min,取上清液,得到CarEs、MFOs、GSTs粗酶液,备用。采用Bradford考马斯亮蓝G-250法^[16]测定蛋白浓度。

1.5.2 CarEs活力测定 参照何林等^[17]、何恒果^[18]的方法。以100 μL α-醋酸萘酯(α-NA,3 \times 10⁻⁴ mol·L⁻¹,内含毒扁豆碱)作为底物,与75 μL酶液在30 °C下反应10 min,然后加入25 μL显色剂[1%(ω,后同)固兰B水溶液:5%十二烷基磺酸钠=2:5],于600 nm处用酶标仪测定OD值。以0.04 mol·L⁻¹ PBS缓冲液(pH=7.0)为对照。所测OD值减去对照OD值,再根据α-萘酚标准曲线和酶源蛋白质含量,将OD值转换成酶比活力(μmol·mg⁻¹·min⁻¹)。

1.5.3 GSTs活性测定 参照Clark等^[19]的方法。以10 μL 1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)与30 μL还原型谷

胱甘肽(GSH)在240 μL 66 mmol·L⁻¹磷酸缓冲液PBS中经20 μL GSTs催化发生反应,在37 °C条件下,于340 nm处用酶标仪测定OD值。每隔30 s测定1次,记录5 min。参照Habig等^[20]的方法,依照以下公式计算GSTs比活力(μmol·mg⁻¹·min⁻¹)。GSTs活力单位(μmol·min⁻¹)=(ΔOD₃₄₀×V)/(ε×L),式中ΔOD₃₄₀为每min吸光值的变化量,V为反应体系、ε为生成物的消光系数(0.009 6 L·μmol⁻¹·cm⁻¹),L为光程(cm)。GSTs比活力(μmol·mg⁻¹·min⁻¹)=酶活力单位/酶源蛋白含量。

1.5.4 MFOs活力测定 参照Kim等^[21]的方法。以10 μL对硝基苯甲醚p-NA为底物,100 μL NADPH为电子供体,在90 μL 0.1 mol·L⁻¹ PBS缓冲液(pH 7.8)中加入100 μL酶液,在37 °C水浴反应30 min后,用100 μL盐酸终止反应,然后用500 μL氯仿萃取,静置10 min后,在氯仿层移取300 μL到另一组试管内,加300 μL 0.5 mol·L⁻¹ NaOH萃取,在400 nm下用酶标仪测定OD值。根据对硝基苯酚标准曲线和酶源蛋白含量,求出酶比活力(μmol·mg⁻¹·min⁻¹)。

1.5.5 酶学动力学参数测定 参照Wilkinson^[22]的方法。将底物稀释成不同浓度梯度,采用Lineweaver-Burk双倒数作图法计算K_m和V_{max}值。

1.6 数据分析

数据均用Excel 2013和SPSS 19.0分析,采用Duncan氏新复极差法分析差异显著性。

2 结果与分析

2.1 甲氰菊酯对苹果蠹蛾的毒力测定

甲氰菊酯对苹果蠹蛾的毒力测定结果见表1。计算得到甲氰菊酯对苹果蠹蛾3龄幼虫的LC₁₀和

表1 甲氰菊酯对苹果蠹蛾3龄幼虫的毒力(95% CL)

Table 1 Toxicity of fenpropathrin to the 3rd larvae of *Cydia pomonella* (95% CL)

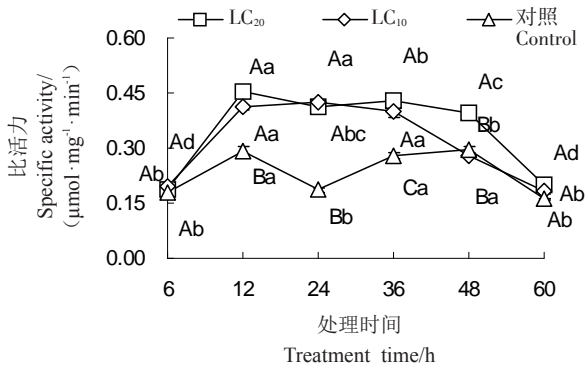
杀虫剂 Insecticide	回归方程 Regression equation	卡方值 Chi square, $\chi^2(df=3)$	LC ₁₀ /(mg·L ⁻¹)	LC ₂₀ /(mg·L ⁻¹)	LC ₅₀ /(mg·L ⁻¹)
甲氰菊酯 Fenpropathrin	$Y=2.476X+2.527$	1.324	3.035 (1.646~4.364)	4.650 (2.946~6.252)	10.521 (8.062~13.846)

LC₂₀分别为3.035和4.650 mg·L⁻¹。

2.2 解毒酶活力测定

2.2.1 甲氰菊酯对苹果蠹蛾CarEs的比活力 苹果蠹蛾经甲氰菊酯处理后,CarEs比活力随时间的变化情况如图1所示。LC₂₀处理后,CarEs比活力在12、24、36、48 h时显著高于对照($P < 0.05$),分别为

对照的1.54、2.19、1.53和1.34倍,6和60 h时差异不显著;LC₁₀处理后,CarEs比活力在12、24、36 h时显著高于对照($P < 0.05$),分别为对照的1.40、2.27和1.42倍,其他时间点与对照差异不显著;48 h时LC₂₀是LC₁₀的1.41倍,差异显著($P < 0.05$),其余时间2个处理之间差异不显著($P > 0.05$)。



不同小写字母表示同一处理不同时间解毒酶比活力差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示同一时间不同处理解毒酶比活力差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

Different small letters indicate significant difference of specific activity at different time after the same treatment ($P < 0.05$), different capital letters indicate significant differences of specific activity under different treatments at the same time ($P < 0.05$). The same below.

图 1 甲氰菊酯处理后苹果蠹蛾 CarEs 的比活力

Fig. 1 Specific activities of CarE in *Cydia pomonella* after being treated with fenproprathrin

2.2.2 甲氰菊酯对苹果蠹蛾 GSTs 的比活力 苹果蠹蛾经甲氰菊酯处理后, GSTs 比活力随时间的变化情况如图 2 所示。LC₂₀ 处理下 GSTs 比活力在 12、24、36、和 48 h 时显著高于对照 ($P < 0.05$), 分别为对照的 1.10、1.26、1.26 和 1.18 倍, 6 和 60 h 时差异不显著; LC₁₀ 处理下 GSTs 比活力只在 48 h 时显著高于对照 ($P < 0.05$), 高出 10.77%, 其余时间均无明显变化。

2.2.3 甲氰菊酯对苹果蠹蛾 MFOs 的比活力 苹果蠹蛾经甲氰菊酯处理后的 MFOs 比活力随时间的变化情况如图 3 所示。LC₂₀ 处理下, MFOs 比活力在 12、24 和 36 h 时显著高于对照 ($P < 0.05$), 分别为对照的 1.46、1.46 和 1.56 倍, 48 h 时显著低于对照 ($P < 0.05$), 为对照的 0.89 倍, 其余时间差异不显著; LC₁₀ 处理下 MFOs 比活力在 12、24 和 36 h 时显著高于对

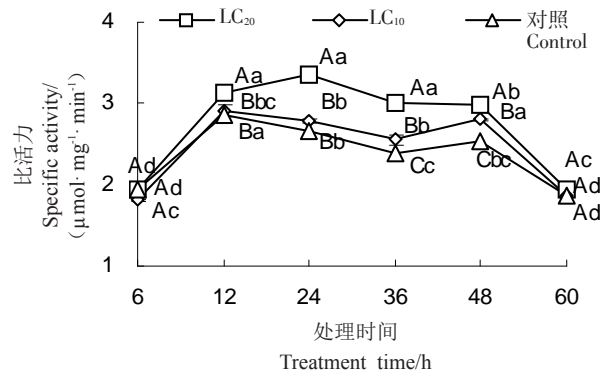


图 2 甲氰菊酯处理后苹果蠹蛾 GSTs 的比活力
Fig. 2 Specific activities of GST in *Cydia pomonella* after being treated with fenproprathrin

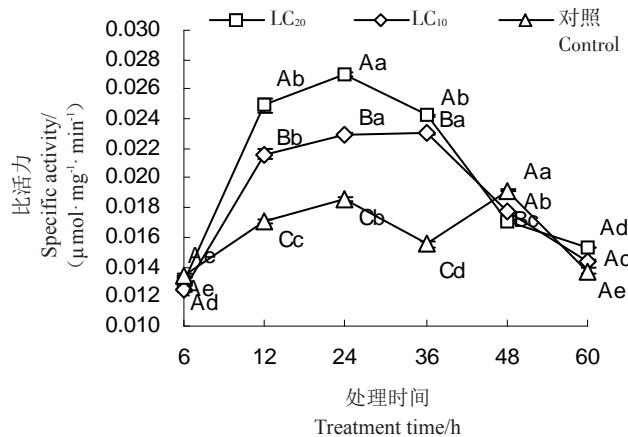


图 3 甲氰菊酯处理后苹果蠹蛾 MFOs 的比活力
Fig. 3 Specific activities of MFO in *Cydia pomonella* after being treated with fenproprathrin

照 ($P < 0.05$), 分别为对照的 1.26、1.24 和 1.48 倍, 其余时间差异均不显著。

2.2.4 甲氰菊酯对苹果蠹蛾三种解毒酶的动力学参数 (1) 甲氰菊酯对苹果蠹蛾 CarEs 的动力学参数。苹果蠹蛾幼虫经甲氰菊酯 LC₁₀ 和 LC₂₀ 质量浓度处理后, K_m 和 V_{max} 的变化如表 2 所示。LC₂₀ 处理下, K_m 在 6、12、24、36、48 和 60 h 均显著低于对照 ($P <$

表 2 甲氰菊酯对苹果蠹蛾 CarEs 的动力学参数

Table 2 The kinetic parameters of CarE in the 3rd larvae of *Cydia pomonella* after being treated with fenproprathrin

时间 Time/h	米氏常数 K_m /(mmol·L ⁻¹)			最大反应速率 V_{max} /(nmol·μg ⁻¹ ·min ⁻¹)		
	对照 Control	LC ₁₀	LC ₂₀	对照 Control	LC ₁₀	LC ₂₀
6	0.950±0.018 dA	0.636±0.019 dB	0.569±0.025 dB	3.715±0.112 aB	3.946±0.147 bB	4.628±0.228 aA
12	1.368±0.019 bA	0.925±0.020 bB	0.860±0.026 aB	2.680±0.108 cB	3.183±0.097 dA	3.199±0.083 cA
24	1.151±0.029 cA	1.094±0.020 aA	0.784±0.022 bB	2.806±0.134 cA	3.008±0.149 cdA	3.013±0.108 cA
36	1.221±0.019 cA	0.873±0.016 bB	0.858±0.012 aB	3.329±0.085 bA	3.489±0.068 bcA	3.672±0.169 bA
48	1.528±0.035 aA	0.773±0.018 cB	0.724±0.019 bB	2.298±0.129 dC	3.623±0.146 bcB	4.182±0.074 aA
60	0.886±0.021 dA	0.583±0.014 dB	0.640±0.018 cB	3.982±0.135 aA	4.399±0.209 aA	4.436±0.146 aA

0.05), 分别比对照低 40.00%、37.23%、32.17%、29.51%、52.94%和 28.09%。 V_{max} 在 6、12 和 48 h 分别比对照高 24.59%、19.36%和 81.97% ($P < 0.05$), 其余时间差异不显著。LC₁₀ 处理下, K_m 在 24 h 时与对照差异不显著, 其余时间点均显著低于对照 ($P < 0.05$), 6、12、36、48 和 60 h 时分别比对照低 32.63%、32.12%、28.69%、49.67%和 34.83%。 V_{max} 在 24 和 48 h 时分别比对照高 18.78%和 57.63%, 其余时间差异不显著。

(2) 甲氰菊酯对苹果蠹蛾 GSTs 的动力学参数。

苹果蠹蛾经甲氰菊酯 LC₁₀ 和 LC₂₀ 质量浓度处理后, K_m 值和 V_{max} 的变化如表 3 所示。LC₂₀ 处理下 K_m 在 24、36、48 和 60 h 时显著高于对照 ($P < 0.05$), 分别升高了 19.31%、15.85%、11.95%和 24.93%, V_{max} 在 6~60 h 6 个时间点上均显著低于对照 ($P < 0.05$), 分别降低了 17.48%、26.40%、48.20%、18.57%、23.55% 和 13.50%。LC₁₀ 处理下, K_m 只在 60 h 时明显上升了 15.40%, 其余时间与对照差异均不显著, V_{max} 在 6~60 h 6 个时间点上均显著低于对照 ($P < 0.05$), 分别降低了 11.04%、19.28%、16.55%、12.42%、10.73%和 7.10%。

表 3 甲氰菊酯对苹果蠹蛾 GSTs 的动力学参数

Table 3 The kinetic parameters of GSTs in the 3rd larvae of *Cydia pomonella* after being treated with fenprothrin

时间 Time/h	米氏常数 K_m /(mmol·L ⁻¹)			最大反应速率 V_{max} /(nmol·μg ⁻¹ ·min ⁻¹)		
	对照 Control	LC ₁₀	LC ₂₀	对照 Control	LC ₁₀	LC ₂₀
6	0.533±0.017 deA	0.539±0.015 cA	0.556±0.019 dA	3.958±0.112 abA	3.521±0.068 bAB	3.266±0.197 abB
12	0.672±0.017 aA	0.689±0.018 aA	0.721±0.016 aA	2.944±0.103 cA	2.377±0.070 dB	2.167±0.104 dB
24	0.629±0.012 abB	0.640±0.028 abB	0.750±0.015 aA	3.115±0.092 cA	2.599±0.101 dB	1.614±0.161 eC
36	0.554±0.025 cdB	0.593±0.019 bcAB	0.642±0.018 bcA	3.760±0.124 bA	3.293±0.105 bB	3.062±0.045 cB
48	0.597±0.012 bcB	0.650±0.026 abAB	0.668±0.010 bA	3.314±0.183 cA	2.959±0.103 cAB	2.534±0.122 dB
60	0.484±0.012 eB	0.558±0.013 cA	0.604±0.017 cdA	4.248±0.085 aA	3.946±0.081 aAB	3.674±0.138 aB

(3) 甲氰菊酯对苹果蠹蛾 MFOs 的动力学参数。苹果蠹蛾经甲氰菊酯 LC₁₀ 和 LC₂₀ 质量浓度处理后 MFOs 的 K_m 值和 V_{max} 随时间的变化如表 4 所示。LC₂₀ 处理下, K_m 在 24 和 36 h 时明显比对照高 21.83% 和 42.04%, 48 h 时显著低于对照 24.75%, 其余时间

差异不显著, V_{max} 在 6、24、36 和 60 h 显著低于对照 ($P < 0.05$), 分别降低了 14.24%、15.29%、27.20%和 12.30%。LC₁₀ 处理下 K_m 在 36 h 时比对照高出 35.53%, 48 h 时低于对照 20.94%, 其余时间差异不显著, V_{max} 在 6 和 36 h 分别低于对照 13.16% 和

表 4 甲氰菊酯对苹果蠹蛾 MFOs 的动力学参数

Table 4 The kinetic parameters of MFOs in the 3rd larvae of *Cydia pomonella* after being treated with fenprothrin

时间 Time/h	米氏常数 K_m /(mmol·L ⁻¹)			最大反应速率 V_{max} /(nmol·μg ⁻¹ ·min ⁻¹)		
	对照 Control	LC ₁₀	LC ₂₀	对照 Control	LC ₁₀	LC ₂₀
6	0.327±0.015 dA	0.337±0.018 eA	0.345±0.011 dA	4.515±0.103 aA	3.921±0.114 aB	3.872±0.156 aB
12	0.406±0.015 bcA	0.415±0.012 bcA	0.457±0.021 bA	3.167±0.071 cdA	3.088±0.104 cdA	2.856±0.185 bA
24	0.426±0.019 bB	0.457±0.016 bB	0.519±0.017 aA	2.979±0.091 cdA	2.794±0.097 dAB	2.524±0.127 bB
36	0.371±0.016 cdB	0.506±0.016 aA	0.530±0.018 aA	2.798±0.165 dA	2.304±0.101 eB	2.037±0.094 cB
48	0.495±0.011 aA	0.391±0.017 cdB	0.372±0.016 bcB	3.265±0.173 cA	3.369±0.171 bcA	3.441±0.113 aA
60	0.345±0.026 dA	0.351±0.013 deA	0.366±0.009 cdA	4.046±0.065 bA	3.612±0.112 abAB	3.549±0.189 aB

17.64%, 其余时间差异不显著。

3 讨论

杀虫剂的亚致死效应给害虫提供了持续的选择压力, 加快了害虫抗药性的产生。近年来, 药剂的不合理使用使害虫的抗药性不断增强, 目标害虫猖獗发生, 次要害虫上升为主要害虫^[23]。昆虫体内

的解毒酶活性能被各种外源化合物诱导, 这种诱导作用是昆虫对有毒物质(杀虫剂)的一种适应性^[24], 即昆虫在受到非常严重的化学环境压力作用下能迅速作出反应, 解毒酶通过解毒和排毒维持昆虫的正常生理代谢而存活下来^[25]。其中, CarEs、GSTs 及 MFOs 是昆虫对杀虫剂产生代谢抗性的重要酶系。

本研究中 LC₁₀ 与 LC₂₀ 质量浓度的甲氰菊酯处理

苹果蠹蛾 3 龄幼虫后,其体内 CarEs、GSTs 和 MFOs 的活性随时间的延长变化较大。说明甲氰菊酯对苹果蠹蛾幼虫体内的解毒酶有诱导作用,且在不同时间反应存在差异,可能是苹果蠹蛾在不同质量浓度选择压胁迫下的一种生存对策^[26]。这与尹显慧等^[27]的研究结果一致。

V_{max} 为最大反应速度, K_m 值反映了酶与底物结合的性质, K_m 值越大,表示酶与底物的亲和力越小,反之亦然。本研究中 LC₁₀、LC₂₀ 质量浓度的甲氰菊酯处理苹果蠹蛾 3 龄幼虫后, CarEs 的 K_m 下降程度最大, V_{max} 升高程度最大,即 CarEs 与底物的亲和力最强,反应速率最大。而 MFOs 和 GSTs 的 K_m 和 V_{max} 与对照相比,或亲和力下降反应速率降低,或无明显变化。由此推测甲氰菊酯处理苹果蠹蛾幼虫后, CarEs 通过比活力的升高和解毒能力的增强使苹果蠹蛾对甲氰菊酯产生抗性,与孟和生等^[28]用甲氰菊酯汰选橘全爪螨抗性种群,发现橘全爪螨抗甲氰菊酯品系的羧酸酯酶比活力高于敏感品系的研究结果一致。LC₁₀ 和 LC₂₀ 质量浓度的甲氰菊酯处理苹果蠹蛾幼虫后,体内的 3 大解毒酶除 LC₁₀ 质量浓度下的 GSTs 无明显变化外,其余处理组 3 种解毒酶比活力在药剂处理后一定时间内均显著升高,之后又下降至对照组水平。LC₂₀ 质量浓度部分时间点显著高于 LC₁₀ 质量浓度处理组,说明高质量浓度甲氰菊酯会使苹果蠹蛾 3 大解毒酶在短时间内发生明显的变化,证明其体内 3 大解毒酶代谢增强,从而对甲氰菊酯表现出更强的适应性。试验中还发现,对照组 MFOs 比活力在 48 h 后突然增大,显著高于其余时间段 ($P < 0.05$),而 LC₁₀ 和 LC₂₀ 质量浓度甲氰菊酯处理后,在 36 h 趋于正常,48 h 显著低于对照组 ($P < 0.05$),这可能与对照组的进食或者环境的变化有关。

另外,笔者仅探讨了室内条件下 LC₁₀、LC₂₀ 质量浓度的甲氰菊酯对苹果蠹蛾 3 龄幼虫体内解毒酶随时间的变化动态及动力学参数的变化,有必要进一步通过监测田间种群对不同杀虫剂的抗性水平进行药剂筛选,进而测定其解毒酶活性,最终筛选出抗性种群有用的增效剂或杀虫剂混用配方,为生产实践提供用药指导。

参考文献 References:

[1] DENNI H S. Agricultural insect pests of temperate region and their control [M]. London: Cambridge University Press, 1987:

337-339.

- [2] 秦晓辉, 马德成, 张煜, 李广华, 王培. 苹果蠹蛾在我国西北发生危害情况 [J]. 植物检疫, 2006, 20(2): 49-51.
- QIN Xiaohui, MA Decheng, ZHANG Yu, LI Guanghua, WANG Pei. The harmfulness of *Cydia pomonella* in the northwest China [J]. Plant Quarantine, 2006, 20(2): 49-51.
- [3] 杨建强, 赵骁, 严勇敢, 张雅林, 冯纪年. 7 种药剂对苹果蠹蛾的防治效果 [J]. 西北农业学报, 2011, 20(9): 191-196.
- YANG Jianqiang, ZHAO Xiao, YAN Yonggan, ZHANG Yalin, FENG Jinian. Efficacy of seven kinds of pesticides for controlling codling moth *Cydia pomonella* [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2011, 20(9): 191-196.
- [4] DAVID G, JAMES S, TANYA S. Fecundity in two spotted spider mite (Acari: Tetranychidae) is increased by direct and systemic exposure to imidacloprid [J]. Journal of Economic Entomology, 2002, 95(4): 729-732.
- [5] NEMOTO H. Mechanism of resurgence of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae) [J]. Japan Agriculture Research Quarterly, 1993, 27(1): 27-30.
- [6] MOORE A, TABASHNIK B E, RETHWISCH M D. Sublethal effects of fenvalerate on adults of the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) [J]. Journal of Economic Entomology, 1992, 85(5): 1624-1627.
- [7] PERVEEN F. Sublethal effects of chlorfluazuron on reproductivity and viability of *Spodoptera litura* (F.) (Lep., Noctuidae) [J]. Journal of Applied Entomology, 2000, 124(5/6): 223-231.
- [8] 张自启, 仲嘉伟, 韩瑞华, 刘长营. 氯虫苯甲酰胺对二点委夜蛾的亚致死效应研究 [J]. 西南农业学报, 2014, 27(5): 1949-1952.
- ZHANG Ziqi, ZHONG Jiawei, HAN Ruihua, LIU Changying. Sublethal effects of chlorantraniliprole on *Athetis lepigone* [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2014, 27(5): 1949-1952.
- [9] 柏敏敏, 郑贵彬. 番茄枯萎抗病性室内鉴定方法研究 [J]. 植物病理学报, 1997, 27(1): 59-63.
- BAI Minzhan, ZHENG Guibin. A method for determination of resistance to tomato fusarium with in greenhouse [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1997, 27(1): 59-63.
- [10] 沈慧敏. 苹果黄蚜抗甲氰菊酯种群对 13 种杀虫剂的交互抗性研究 [J]. 农药, 1998(1): 20-22.
- SHEN Huimin. Study on cross-resistance of fenprothrin-resistant strains of the *Aphis citricola* to 13 pesticides [J]. Pesticides, 1998(1): 20-22.
- [11] 何玉仙, 黄建. 烟粉虱抗药性的研究进展 [J]. 生物安全学报, 2005, 14(4): 336-342.
- HE Yuxian, HUANG Jian. Advance of insecticide resistance in *Bemisia tabaci* [J]. Journal of Biosafety, 2005, 14(4): 336-342.
- [12] DUNLEY J E, WELTER S C. Correlated insecticide cross-resistance in azinphosmethyl resistant codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) [J]. Journal of Economic Entomology, 2000, 93(3): 955-962.

- [13] REYES M, SAUPHANOR B. Resistance monitoring in codling moth: a need for standardization. [J]. Pest Management Science, 2008, 64(9): 945-953.
- [14] BOUVIER J C, CUANY A, MONIER C, BROSSE V, SAUPHANOR B. Enzymatic diagnosis of resistance to deltamethrin in diapausing larvae of the codling moth, *Cydia pomonella*, (L.) [J]. Archives of Insect Biochemistry & Physiology, 1998, 39(2): 55-64.
- [15] KONANZ S. Characterization of mechanisms of resistance to common insecticides in noctuid pest species and resistance risk assessment for the new lepidopteran specific compound flubendiamide [D]. Stuttgart: University Hohenheim, 2009.
- [16] BRADFORD W W. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1): 248-254.
- [17] 何林, 谭仕禄, 曹小芳, 赵志模, 邓新平, 王进军. 朱砂叶螨的抗药性选育及其解毒酶活性研究[J]. 农药学报, 2003, 5(4): 23-29.
HE Lin, TAN Shilu, CAO Xiaofang, ZHAO Zhimo, DENG Xinping, WANG Jinjun. Study on resistance selection and activity of detoxification enzyme in *Tetranychus cinnabarinus*[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2003, 5(4): 23-29.
- [18] 何恒果. 桔全爪螨对甲氧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.
HE Hengguo. Fenprothrin and avermectin resistance, and esterase gene cloning and expression in *Panonychus citri* (McGregor) [D]. Chongqing: Southwest University, 2010.
- [19] CLARK A G, DICK G L, SMITH J N. Kinetic studies on a glutathione S-transferase from the larvae of *Costelytra zealandica* [J]. Biochemistry, 1984, 217(1): 51-58.
- [20] HABIG W H, PABST M J, JAKOBY W B. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1974, 249(22): 7130-7139.
- [21] KIM Y J, PARK H M, CHO J R, AHN Y J. Multiple resistance and biochemical mechanisms of pyridaben resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) [J]. Journal of Economic Entomology, 2006, 99(3): 954-958.
- [22] WILKINSON G N. Statistical estimations in enzyme kinetics [J]. Biochemical Journal, 1961, 80(2): 324-332.
- [23] 尹飞, 冯夏, 李振宇, 林庆胜, 胡珍娣, 张德雍, 陈焕瑜. 亚致死剂量氯虫苯甲酰胺对小菜蛾体内活性酶的影响[J]. 植物保护, 2014, 40(2): 66-69.
YIN Fei, FENG Xia, LI Zhenyu, LIN Qingsheng, HU Zhendi, ZHANG Deyong, CHEN Huanyu. Effects of sublethal concentrations of chlorantraniliprole on detoxifying enzyme activity in *Plutella xylostella* (L.) [J]. Plant Protection, 2014, 40(2): 66-69.
- [24] 唐振华, 毕强. 杀虫剂作用的分子行为[M]. 上海: 上海远东出版社, 2003: 675.
TANG Zhenhua, BI Qiang. Molecular behavior of insecticides action [M]. Shanghai: Shanghai Far East Press, 2003: 675.
- [25] 唐振华. 昆虫抗药性及其治理[M]. 北京: 农业出版社, 1993.
TANG Zhenhua. Insecticide resistance and treatment of insects [M]. Beijing: Agricultural Press, 1993.
- [26] 陈列忠, 王开金, 陈建明, 吕仲贤, 郑许松, 徐红星, 张珏锋, 俞晓平. 雷公藤生物碱对小菜蛾幼虫生长及其解毒酶系的影响[J]. 生物安全学报, 2005, 14(3): 238-242.
CHEN Liezhong, WANG Kaijin, CHEN Jianming, LÜ Zhongxian, ZHENG Xusong, XU Hongxing, ZHANG Juefeng, YU Xiaoping. Effect of tripterygium wilfordii alkaloids on diamondback moth (*Plutella xylostella*) larval growth and 2 detoxification enzyme activities[J]. Journal of Biological Safety, 2005, 14(3): 238-242.
- [27] 尹显慧, 吴青君, 李雪锋, 张友军, 徐宝云. 多杀菌素亚致死浓度对小菜蛾解毒酶系活力的影响 [J]. 农药学报, 2008, 10(1): 28-34.
YIN Xianhui, WU Qingjun, LI Xuefeng, ZHANG Youjun, XU Baoyun. Effect of sublethal concentrations of spinosad on the activities of detoxifying enzymes in the larvae of diamondback moth *Plutella xylostella* [J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2008, 10(1): 28-34.
- [28] 孟和生, 王开运, 姜兴印, 仪美芹. 桔全爪螨的抗药性选育及其解毒酶活力变化[J]. 昆虫学报, 2002, 45(1): 58-62.
MENG Hesheng, WANG Kaiyun, JIANG Xingyin, YI Meiqin. Studies on resistance selection by abamectin and fenprothrin and activity change of detoxicant enzymes in *Panonychus citri* [J]. Acta Entomologica Sinica, 2002, 45(1): 58-62.