

朱砂叶螨对天然杀螨活性物质东莨菪内酯的抗性评价

张永强, 丁伟, 王丁祯

(西南大学植物保护学院, 重庆 400716)

摘要: [目的]通过室内抗药性筛选, 比较了朱砂叶螨对植物源杀螨活性物质东莨菪内酯和螺螨酯的抗性发展差异。[结果]在70%的选择压力下, 筛选18代, 朱砂叶螨对东莨菪内酯的抗性系数基本没有变化。同期, 对螺螨酯的抗药性发展速度较快, 在相同选择压力下, 筛选至14代, 抗性系数达18.88。b值分析表明: 这一种群中出现了抗性杂合子, 而且有增多的趋势。[结论]对进一步研究东莨菪内酯的杀螨作用机理及新型杀螨剂开发具有重要的理论指导意义。

关键词: 朱砂叶螨; 东莨菪内酯; 抗药性评价; 螺螨酯

中图分类号: S482.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1006-0413(2011)03-0226-03

The Resistance Evaluation of *Tetranychus cinnabarinus* against Natural Acaricidal Compound Scopoletin

ZHANG Yong-qiang, DING Wei, WANG Ding-zhen

(College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: [Aims] The resistance evaluations of botanical acaricidal compounds scopoletin and spirotetramethanol were carried out in the laboratory in order to find out their difference. [Results] The results showed that the carmine spider mite exhibited no resistance to scopoletin by 18 generation screening. However, *Tetranychus cinnabarinus* produced resistance to spirotetramethanol quickly, under the same selection pressure of 70% mortality, and by screening of 14 generations, resistance index reached 18.88. Analysis of b value suggested that mixed heterozygotes with resistance appeared in the population, and the number had significant increasing tendency, this is a clear signal of generated resistance. [Conclusions] This result proved theoretical conduction for further study of scopoletin acaricidal mechanism and development of novel acaricides based on scopoletin.

Key words: *Tetranychus cinnabarinus*; scopoletin; resistance evaluation; spirotetramethanol

朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* 为害范围广, 抗性问题严重^[1], 防治困难。生物农药在防治害螨方面具有一定的优势^[2], 开发天然活性杀螨活性物质是当前杀螨剂研究的热点之一^[3]。有研究表明: 地肤 *Kochia scoparia*^[4] 和河朔莢花 *Wikstroemiae chamedaphne*^[5] 有效杀螨成分主要作用于山楂叶螨的 Ca^{2+} -ATP酶, 酶被抑制, 可能会破坏细胞内外 Ca^{2+} 的平衡, 影响神经细胞的兴奋和传导, 引起神经传递的阻断。这可能是天然活性物质的作用机制之一, 但有关害螨对天然活性化合物会不会存在抗性问题未见报道。从中药植物黄花蒿 *Artemisia annua* 分离纯化的杀螨活性物质东莨菪内酯^[6] 是否会对朱砂叶螨同样存在抗药性问题呢? 带着这个疑问, 笔者进行了抗药性的选育, 并选择了拜耳作物科学公司新近上市的杀螨剂品种螺螨酯为对照药剂。

1 材料与方法

1.1 供试螨类

朱砂叶螨最初采自重庆北碚区田间的豇豆苗上, 已在

人工气候室内用盆栽豇豆苗饲养了5年约120代, 期间未接触任何农药。温度 $(26 \pm 1) ^\circ C$, 60%~80% RH, L:D=14 h:10 h (3000 lx)。

1.2 供试药剂

东莨菪内酯(scopoletin), 为实验室分离纯化所得, 并于标准品对比验证其含量为96.5%。

螺螨酯(spirotetramethanol, 240 g/L SC), 购自拜耳作物科学(中国)有限公司。

1.3 抗药性评价的测定方法

将供试螨分成3个部分, 其一不做任何处理, 为敏感种群; 剩下2个种群分别用东莨菪内酯和螺螨酯进行处理, 每次处理前做1次生测试验, 算出可以杀死种群70%个体的药量。用上述试验药剂, 以杀死种群70%左右个体的选择压力, 用手持喷雾器喷洒药剂, 喷药后24 h记录1次死亡个数, 并将存活的叶螨个体转移到新的豇豆苗上, 产卵1~2 d后再移走, 待同一代卵发育成新的成熟个体时再次喷药。用药一定代数后, 为保证70%左右的选择压

收稿日期: 2010-09-25, 修返日期: 2011-01-06

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金(XDJK2009C140)

作者简介: 张永强(1980—), 男, 副教授, 博士, 从事天然产物农药研究。E-mail: zhangyq80@tom.com。

力,可能要适当提高用药质量浓度,试验共进行了9个月(约270 d),大约每15 d做1次毒力测定,计算其致死中浓度(LC₅₀),掌握抗药性的发展趋势。

1.4 生物测定方法

参照FAO推荐的测定螨类抗药性的标准方法——玻片浸渍法并加以改进。挑在玻片双面胶带上供试螨在温度(26±1)℃、60%~80% RH的环境下放置4 h,用双目解剖镜检查,剔除死亡和不活泼的个体,记载活螨数。手持无螨端浸入药液5 s,取出用吸水纸小心吸干多余药液。同样条件下培养3 d,每12 h检查1次结果。用毛笔轻触其身体,以螨螯肢不动者为死亡。试验重复5次。线性回归由机率值分析法完成。计算抗性系数,公式如下。

抗性系数(R_i)=
$$\frac{\text{抗性性种群的LC}_{50}\text{值}}{\text{敏感种群的LC}_{50}\text{值}}$$

2 结果与分析

2.1 敏感基线

螨类会不会对药剂产生抗药性,要有一个基准,即敏感基线。敏感基线即是药剂对某种害螨敏感种群的毒力回归直线。东莨菪内酯和螺螨酯对朱砂叶螨的敏感基线及其他相关信息见表1。

表1 东莨菪内酯和螺螨酯对朱砂叶螨的敏感基线

药剂	敏感基线(y=)	卡方值	致死中浓度及95%置信限/(g·L ⁻¹)
东莨菪内酯	1.0160+1.4844x	2.59	0.4829(0.4017~0.5807)
螺螨酯	1.5226+1.3325x	9.24	0.3246(0.2677~0.4256)

从表1看出:螺螨酯对朱砂叶螨的作用效果要好于东莨菪内酯,处理48 h,朱砂叶螨的LC₅₀值为0.3246 g/L,而东莨菪内酯为0.4829 g/L,约为螺螨酯的1.5倍。但经t检验,两者之间不存在显著差异(t=1.03,df=5,P<0.05)。

2.2 东莨菪内酯对朱砂叶螨的抗性选育过程

东莨菪内酯对朱砂叶螨的选育结果见表2。

表2 东莨菪内酯对朱砂叶螨的抗性选育

筛选代数	毒力回归方程(y=)	卡方值	致死中浓度及95%置信限/(g·L ⁻¹)	抗性系数
F ₀	1.0160+1.4844x	2.59	0.4829(0.4017~0.5807)	1
F ₂	1.1248+1.4614x	3.79	0.4484(0.3723~0.5401)	0.93
F ₄	1.3235+1.3645x	4.58	0.4948(0.4064~0.6025)	1.02
F ₆	1.3658+1.3389x	3.37	0.5181(0.4241~0.6328)	1.07
F ₁₀	1.4351+1.3086x	2.28	0.5346(0.4356~0.6560)	1.11
F ₁₄	1.1968+1.4076x	3.36	0.5033(0.4156~0.6095)	1.04
F ₁₈	1.2881+1.3781x	4.26	0.4937(0.4062~0.6001)	1.02

每1代喷1次药(约15 d),间隔2~4代做1次生物测定,表中列出了F₂、F₄、F₆、F₁₀、F₁₄、F₁₈的相关信息,各方程均通过卡方检验,回归直线拟合较好。从中可以看出:朱砂叶螨对东莨菪内酯的抗性没有产生。扣除生物测定自身的

影响因素外,抗性系数基本上没有变化,最大值发生在F₁₀,也仅为1.11。再从b值来分析,b值的变化很小,这也表明了在用东莨菪内酯选育的朱砂叶螨种群中螨体对东莨菪内酯的敏感性较强。

2.3 螺螨酯对朱砂叶螨的抗性选育过程

螺螨酯对朱砂叶螨的抗性选育结果见表3。从表3看出:朱砂叶螨对螺螨酯的抗药性产生速度较快,在70%死亡率的选择压力下,筛选至14代(约210 d),抗性系数达18.88,抗性发展较快的阶段在F₆~F₁₀这个阶段,抗性系数由4.67上升到17.18,而从F₀~F₆和F₁₀~F₁₈这2个阶段比较平缓。而从回归直线的b来分析,回归直线整体由陡变缓,表明这一种群中出现了杂性杂合子,并有所增多,这是抗性产生的一个明显信号。

表3 螺螨酯对朱砂叶螨的抗性选育

筛选代数	毒力回归方程(y=)	卡方值	致死中浓度及95%置信限/(g·L ⁻¹)	抗性系数
F ₀	1.5226+1.3325x	9.24	0.3246(0.2677~0.4256)	1
F ₂	1.4792+1.2996x	4.58	0.5120(0.4167~0.6289)	1.58
F ₄	1.9233+1.0348x	3.45	0.9402(0.7118~1.2417)	2.90
F ₆	2.0030+0.9421x	4.59	1.5174(1.0654~2.1611)	4.67
F ₁₀	1.3175+0.9830x	4.29	5.5767(3.1817~9.7746)	17.18
F ₁₄	2.3523+0.6991x	1.28	6.1288(2.8306~13.2702)	18.88
F ₁₈	2.2563+0.7305x	5.49	5.6979(2.7630~11.7506)	17.55

3 讨论

化学农药引起有害生物防治过程中的“3R”问题,为有害生物的防治带来了很大的麻烦,其中最为严重的就是抗性问题^[7]。抗药性的研究曾在全世界范围内掀起过一个研究热潮,至今也是农药学研究的一个重要方面。东莨菪内酯是新近发现具有杀螨活性的天然活性物质,可以从多种植物中提取出来,在医药领域应用较多^[8],但在农业领域报道甚少。螺螨酯是拜耳作物科学有限公司新近推出的季酮酯类杀螨剂,螺螨酯通过抑制害螨体内的脂肪合成,破坏螨虫的能量代谢活动,最终杀死害螨^[9]。该杀螨剂的作用机理比较新颖,与以往引起害螨抗药性的杀螨剂品种不存在交互抗性,因而可以用来治理对其他杀螨药剂产生抗药性的害螨。本文证实了天然杀螨活性物质东莨菪内酯不易引起害螨抗药性。同时表明在试验条件下,朱砂叶螨对螺螨酯产生了明显的抗性。拜耳作物科学公司的Rauch等^[10]曾发表论文称:在意大利,二斑叶螨(*T. urticae*)对螺螨酯经过21个月,37个选育周期后,表现出一定的抗药性,抗性系数达到13倍。这也在一定程度上为本试验的结果提供了旁证。而实验室发现的天然杀螨活性化合物东莨菪内酯在选育过程中始终没有表现出抗性的趋势,这为进一步拓展东莨菪内酯的开发利用奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] 张永强, 丁伟, 赵志模, 等. 姜黄对朱砂叶螨的生物活性[J]. 植物保护学报, 2004, 31(4): 390-394.
- [2] CAVALCANTI S C H, NICULAU E S, BLANK A F, *et al.* Composition and Acaricidal Activity of *Lippia sidoides* Essential Oil against Two-spotted Spider Mite (*Tetranychus urticae* Koch)[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(2): 829-832.
- [3] KIM D I, PARK J D, KIM S G, *et al.* Screening of Some Crude Plant Extracts for Their Acaricidal and Insecticidal Efficacies[J]. Journal of Asia-Pacific Entomology, 2005, 8(1): 93-100.
- [4] 曹挥, 王有年, 刘素琪, 等. 地肤提取物对山楂叶螨体内几种酶活性的影响[J]. 林业科学, 2007, 43(2): 68-72.
- [5] 曹挥, 王有年, 张铁强, 等. 河朔茺花对山楂叶螨作用机制的初步研究[J]. 林业科学, 2007, 43(8): 65-70.
- [6] ZHANG Y Q, DING W, ZHAO Z M, *et al.* Studies on Acaricidal Bioactivities of *Artemisia annua* L. Extracts Against *Tetranychus cinnabarinus* Bois.(Acari: Tetranychidae)[J]. Agricultural Sciences in China, 2008, 7(5): 577-584.
- [7] 冷培恩, 张晓龙, 李春晓, 等. 不同杀虫剂选育对家蝇抗性水平及kdr基因频率的影响[J]. 昆虫学报, 2009, 52(1): 59-64.
- [8] SILVA W P K, DERANIYAGALA S A, WIJESUNDERA R L C, *et al.* Isolation of Scopoletin from Leaves of *Hevea brasiliensis* and the Effect of Scopoletin on Pathogens of *H. brasiliensis*[J]. Mycopathologia, 2001, 153(4): 199-202.
- [9] 白芸, 许鹏军, 高晓莎, 等. 苹果及土壤中的螺螨酯残留分析方法[J]. 分析科学学报, 2009, 25(2): 229-231.
- [10] RAUCH N, NAUEN R. Spirodiclofen Resistance Risk Assessment in *Tetranychus urticae*(Acari: Tetranychidae): A Biochemical Approach[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2002, 74(2): 91-101.

责任编辑:赵平

(上接第216页)

- [3] NISHIDE H, OGAWA M, TANIMURA T, *et al.* Preparation of 3-Benzoyl-2,4,5-substituted Pyridine Derivatives or Salts Thereof and Fungicides Containing the Same: WO, 2004039155[P]. 2004-05-13.
- [4] 佚名. 巴斯夫推出新杀菌剂Xemium[J]. 浙江化工, 2010, 41(5): 41.
- [5] MARKUS G, JOCHEN D, THOMAS G, *et al.* Pyrazole Carboxylic Acid Anilides, Method for the Method for the Production Thereof and Agents Containing Them for Controlling Pathogenic Fungi: WO, 2006087343[P]. 2006-08-24.
- [6] MICHAEL R, PEER S S, SANDRA L. Process for Preparing Difluoromethylpyrazolyl Carboxylates: WO, 2008053043[P]. 2008-05-08.
- [7] 佚名. 住友新型杀菌剂在欧盟的登记取得进展[J]. 山东农药信息, 2010(4): 40.
- [8] SASSE K, BRANDES W, HANSSLER G, *et al.* 1-Heteroaryl-4-aryl-pyrazolin-5-ones: EP, 0165448[P]. 1985-12-27.
- [9] UTA I, HANSUUYOAHIMU Z, ROBERUTO A S, *et al.* 3-Aminopyrazolone-5-one: JP, 1160968[P]. 1989-06-23.
- [10] KRUEGER B W, FISCHER R, BERTRAM H J, *et al.* 3-Hydroxy-4-aryl-5-oxo-pyrazolin Derivatives: EP, 0508126[P]. 1992-10-14.
- [11] SATO J, OSUMI T, OSAWA N, *et al.* Agent for Controlling Plant Disease: JP, 8208621[P]. 1996-08-13.
- [12] SATO J, OHSUMI T, YAMAZAKI H, *et al.* Plant Disease-controlling Agent: US, 5869687[P]. 1999-02-09.
- [13] ARAKI K, SATO Y, GOMIBICHI T, *et al.* A Use of Sulfonanilides as Herbicide: WO, 2007031208[P]. 2007-03-22.
- [14] 佚名. 丁烯氟虫腈[J]. 农药科学与管理, 2008, 29(9): 58.
- [15] 王正权, 李彦龙, 郭同娟, 等. *N*-苯基吡唑衍生物杀虫剂: CN, 1398515[P]. 2003-02-26.
- [16] 戚明珠, 周景梅, 姜友法, 等. 氯氟醚菊酯的开发及其应用研究[J]. 中华卫生杀虫药械, 2010(3): 172-173.
- [17] 戚明珠, 周景梅, 姜友法, 等. 一种光学活性的拟除虫菊酯类化合物及其制备方法和应用: CN, 101306997[P]. 2008-11-19.
- [18] WATANABE Y, ISHIKAWA K, OTSU Y, *et al.* Nematocidal Trifluorobutenes: WO, 2001002378[P]. 2001-01-11.

责任编辑:赵平

众多生物农药在美寻求登记

美国EPA对农药登记申请者发布了多份申请接受通告,在这些申请中,有很多原药申请是生物农药,还有一些是2010年获批的原药的相关制剂产品的申请。

Loveland roducts公司提交了植物生长调节剂水杨酸0.04%和0.007%浓度相关制剂产品,作为种子处理剂产品。

Marrone Bio Innovations提交的产品是生物杀虫剂/杀螨剂MBI-206 EP(伯克霍尔德氏菌A396菌株,94.5%),这个产品用于防控草皮、观赏性植物和可食用作物中的鳞翅类害虫,如苹果小卷蛾、行军虫、木虱虫和六点黄蜘蛛。

Marrone Bio Innovations公司还提交了另一个生物农药MBI-203 SC(紫色素细菌PRAA-1菌株,86.5%)的登记申请,这个农药用于防控草皮,观赏性植物和可食用作物中的蚜虫、粉虱、食叶鳞翅类和鞘翅类害虫以及刺吸口器类害虫,2010年公司还提交了此原药的另一个剂型产品的登记。

三井公司的下属公司Certis USA提交了CX-9030(枯草芽孢杆菌D747菌株,25%)和CX-9032(枯草芽孢杆菌D747菌株,98.4%)两个生物杀菌剂的产品登记,用于水果、蔬菜、葡萄、咖啡、薄荷、啤酒花、药草、草皮和观赏性植物。(ZP)