

马尾松毛虫对氰戊菊酯的耐药性研究*

彭龙慧

李周直

(江西农业大学)

(南京林业大学)

摘要 应用生物测定技术和生理生化分析方法,对马尾松毛虫进行了耐药性研究,结果表明:①马尾松毛虫对氰戊菊酯的耐药力随龄期增加而增加,6龄幼虫耐药力为3龄幼虫的37倍;②常用拟除虫菊酯的铜山林区对马尾松毛虫尚未形成抗药性;③非专一性酯酶活力随龄期增加而增大,铜山种群酯酶活力较茅山种群为大,这与马尾松毛虫的耐药性水平相一致;④两地种群体壁抗穿透性无异质性。药剂穿透体壁动态研究表明:试虫受药后8h,仍有43.3%的氰戊菊酯未进入体内,体壁中残留的氰戊菊酯量为受药量的1.8%,表明体壁起了屏障作用。

关键词 马尾松毛虫 氰戊菊酯 溴氰菊酯 耐药性 酯酶

马尾松毛虫 (*Dendrolimus punctatus* Walker) 是我国森林中最严重的历史性大害虫,每年发生面积100~300万 hm^2 ,其损失十分可观。在松毛虫综合治理中,合理使用化学农药是挽救损失的重要手段。从80年代开始,主要是使用拟除虫菊酯类农药,取得显著的防治效果。由于拟除虫菊酯类杀虫剂的广泛应用,害虫的抗药性问题已引起重视。国内外农业害虫和卫生害虫中,已有某些种类对这类杀虫剂产生了抗药性^[1]。本文通过对不同品系马尾松毛虫的毒力测定,对不同种群、不同世代马尾松毛虫体内非专一性酯酶活力大小和杀虫剂穿透体壁的动态研究,系统了解马尾松毛虫对氰戊菊酯的敏感程度,并对马尾松毛虫的解毒机理进行初步探讨,为延长拟除虫菊酯类农药的使用寿命提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 供试昆虫

1.1.1 茅山林区种群 系1989年采自江苏省句容县东进林场。此场从1978年至1989年一直保持了低虫口密度,未进行过任何化学防治。此种群在试验中作为敏感种群。

1.1.2 铜山林区种群 系1989年采自江苏省江宁县东善桥林场铜山分场。此分场使用拟除虫菊酯类防治马尾松毛虫的历史已有5a,每年飞防和人工防治2~3次,1989年达4次之多。试验中,此种群用以与茅山种群比较。

所采集的以上两地马尾松毛虫幼虫,经室内饲养后,选健康的幼虫供毒力测定用。室内饲养条件:室温,相对湿度70%~80%,光照10h以上。用新鲜马尾松针叶饲养。

1.2 供试药剂和试剂

1.2.1 杀虫剂 敌百虫,92.2%(南通农药厂);氰戊菊酯,95%(日本住友公司产品);溴

1991-09-19收稿。

* 本研究为国家“七五”攻关项目“二、三代类型区马尾松毛虫综合管理”专题的部分内容。

氰菊酯, 98%(法国 Roussel Uclaf 公司)。

1.2.2 试剂 毒扁豆碱(美国 Fluka 公司产品); α -醋酸萘酯(美国 Sigma 公司产品); 固蓝 B 盐(美国 Fluka 公司产品, 上海化学试剂采购供应站进口分装); 甲萘酚, 分析纯(上海化学试剂三厂产品)。其它一般试剂均采用国产分析纯或化学纯规格。

1.3 毒力测定方法

参照联合国粮农组织(FAO, 1980)^[2]推荐的害虫抗药性标准测定方法和李周直等(1988)^[3]推荐的马尾松毛虫毒力测定方法进行。所用杀虫剂均以丙酮逐级稀释随用随配。

1.3.1 体壁点滴处理 用自制定量毛细管点滴器(毛细管系美国进口, 1.0 μ l/根), 于供试幼虫的前胸背板上点滴 1.0 μ l 药液, 每种药剂稀释 5~6 个浓度, 每浓度处理试虫 15~25 头, 重复 3 次。处理后仍以新鲜马尾松针叶饲养, 24 h 进行效果检查。试虫的死亡判断标准: ①脱肛; ②吐黄水; ③萎缩; ④麻痹(25 $^{\circ}$ C 环境下, 15 min 后仍不爬行, 则按死亡处理, 反之则活)。

1.3.2 注射处理 经乙醚或冰冻麻醉的虫体, 用微量注射器吸取 1.0 μ l 药液, 从前胸侧腹刺入背板下方注射。注射完毕后, 将试虫置于吸水纸上, 让其自行恢复活动。处理后仍以新鲜马尾松针叶喂养, 24 h 后检查死亡数, 死亡判定标准同点滴处理。

毒力测定所得数据均用 Apple II 型微机进行分析。

1.4 非专一性酯酶的活力测定

参照 Van Asperene (1962) 和王荫长等(1986)^[4~6]介绍的方法进行。各龄幼虫均以整体制备酶液。

1.4.1 酶液的制备 取供试幼虫若干, 在分析天平上称重后, 置于预冷的玻璃匀浆器中, 按 5 ml/g 体重加入 0.04 M 的磷酸缓冲液 (pH 7.0), 在冰浴中匀浆, 重复 5 次, 匀浆液在 400 rpm/min 下离心 30 min, 温度控制在 4 $^{\circ}$ C 以下。离心后, 等量合并上清液做酶源。测定时, 用上述缓冲液稀释 200 倍。

1.4.2 测定方法 用 0.04 M 的磷酸缓冲液 (pH 7.0) 将 3×10^{-2} M 的醋酸甲萘酯丙酮母液稀释 100 倍, 配成底物溶液。取底物溶液 5 ml 加入 2×10^{-4} M 毒扁豆碱丙酮液 3 μ l, 在 25 $^{\circ}$ C 水浴中平衡 5 min, 再加入稀释酶液 1 ml 混匀。25 $^{\circ}$ C 下温浴半小时后立即加入显色液 (1% 固蓝 B 盐溶液与 5% 十二烷基硫酸钠溶液, 用前以 2:5 比例混合而成) 1 ml, 摇匀, 再温浴半小时, 然后用 72 型分光光度计在 600 nm 下比色, 测定光密度值, 用以与标准曲线对照, 求出酯酶活力大小 (活力单位: mM/min·g)。

标准曲线用 6 ml 不同浓度的甲萘酚溶液各加 1 ml 显色剂, 在 600 nm 下测光密度值制成。

1.5 氰戊菊酯穿透体壁的测定

1.5.1 样品制备与提取 将 1 μ l 氰戊菊酯丙酮液点滴于试虫前胸背板, 引入量为 0.2 μ g/头, 点滴后于 0、0.5、1、2、4、8 h 分别取试虫 5 头, 用 30 ml 石油醚丙酮液 (1:1) 淋洗虫体表面, 收集淋洗液于真空旋转浓缩仪中, 在 50 $^{\circ}$ C 下浓缩至 5 ml, 然后转移至 5 ml 刻度浓缩管中, 于恒温水浴中 (40 $^{\circ}$ C) 吹 N_2 浓缩, 定容至 1 或 2 ml, 待测。将上述淋洗过的试虫解剖, 去内脏后, 将体壁剪碎于 100 ml 具塞三角瓶中, 加 30 ml 上述溶液振荡提取半小时, 过滤后, 收集滤液, 残渣再用 15 ml 上述溶液振荡提取半小时。过滤, 合并二次滤液, 如上浓缩, 定容至 1 或 2 ml 待测, 每处理重复 3 次。

1.5.2 气相色谱测定 采用GC-9A型气相色谱仪, Ni^{63} 电子捕获检测器测定氰戊菊酯残留量。色谱柱为 $\phi 3.2 \text{ mm} \times 1.1 \text{ m}$ 玻璃柱, 填充 2% OV-1/chromasorb W. A. DMC. S, 60~80目, Inj T278 $^{\circ}\text{C}$, Col T238 $^{\circ}\text{C}$, Dete T278 $^{\circ}\text{C}$ 载气(高纯氮) 60 ml/min。氰戊菊酯最小检测量: $1 \times 10^{-14} \text{ g}$, 用外标法定性定量。

取未处理试虫 5 头, 按上述方法分别做体表淋洗和体壁添加回收率测定, 测定结果为体表淋洗: $86.0\% \pm 2.8\%$; 体壁: $87.1\% \pm 3.5\%$ 。

2 结果与分析

2.1 各龄马尾松毛虫幼虫对氰戊菊酯的敏感程度

用氰戊菊酯对铜山林区一代马尾松毛虫各龄幼虫进行毒力测定结果表明: 马尾松毛虫对氰戊菊酯的耐药力随龄期的增加而增大(表 1)。以平均每头幼虫受药量计算, 3 龄幼虫最

表 1 氰戊菊酯对马尾松毛虫幼虫的触杀毒力

(1989)

| 龄 期 | 平均体重 (g) | 毒力回归曲线 $y =$ | 斜 率 b | 相关系数 r | LD ₅₀ | |
|-----|-------------|-------------------|------------|-------------|----------------------------|----------------------------|
| | | | | | ($\mu\text{g}/\text{头}$) | ($\mu\text{g}/\text{g}$) |
| 3 | 0.135 | $7.796 + 1.475 x$ | 1.475 | 0.991 | 1.272×10^{-2} | 9.425×10^{-2} |
| 4 | 0.316 | $7.619 + 1.719 x$ | 1.719 | 0.986 | 3.004×10^{-2} | 9.505×10^{-2} |
| 5 | 0.576 | $6.751 + 1.436 x$ | 1.436 | 0.994 | 6.034×10^{-2} | 0.1048 |
| 6 | 1.111 | $5.699 + 2.148 x$ | 2.148 | 0.984 | 0.473 | 0.426 |

敏感, LD₅₀ 为 $1.27 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{头}$; 6 龄幼虫耐药性最强, LD₅₀ 为 $0.473 \mu\text{g}/\text{头}$ 。6 龄幼虫耐药性较 3 龄幼虫强 37 倍, 4、5 龄幼虫耐药性则分别为 3 龄幼虫的 2.4 倍和 4.7 倍。以平均每克体重受药量衡量, 3 龄幼虫仍对氰戊菊酯最敏感, LD₅₀ 为 $9.425 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{g}$, 6 龄幼虫耐药性仍最强, LD₅₀ 为 $0.426 \mu\text{g}/\text{g}$, 但两者只相差 4.5 倍, 而 3、4、5 龄之间的耐药性差异则消失。

2.2 三种杀虫剂对铜山林区 4 龄马尾松毛虫幼虫的触杀毒力比较

用敌百虫、氰戊菊酯和溴氰菊酯对铜山第一代马尾松毛虫 4 龄幼虫进行触杀毒力测定(表 2), 结果表明, 拟除虫菊酯杀虫剂对马尾松毛虫较有机磷杀虫剂有更强的毒性。氰戊菊酯和溴氰菊酯的触杀毒力分别是敌百

表 2 三种杀虫剂对马尾松毛虫 4 龄幼虫的触杀毒力

| 药 剂 | 毒力回归曲线 $y =$ | 斜 率 b | 相关系数 r | LD ₅₀ |
|------|-------------------|------------|-------------|----------------------------|
| | | | | ($\mu\text{g}/\text{头}$) |
| 敌百虫 | $3.493 + 1.926 x$ | 1.926 | 0.982 | 6.063 |
| 氰戊菊酯 | $7.619 + 1.719 x$ | 1.719 | 0.986 | 3.004×10^{-2} |
| 溴氰菊酯 | $10.05 + 1.880 x$ | 1.880 | 0.979 | 2.06×10^{-3} |

虫触杀毒力的 202 倍和 2 943.2 倍。溴氰菊酯的触杀毒力又较氰戊菊酯强 14.6 倍。

2.3 溴氰菊酯、氰戊菊酯对铜山、茅山两地种群的触杀毒力比较

于 1989 年 4 月初用溴氰菊酯对茅山、铜山两地越冬后马尾松毛虫 4 龄幼虫进行毒力测定; 又于 1989 年 11 月初用氰戊菊酯对茅山、铜山两地越冬前 4 龄马尾松毛虫幼虫进行毒力测定(表 3)。结果表明, 铜山林区的马尾松毛虫对溴氰菊酯和氰戊菊酯的耐药性出现增高的趋势, 溴氰菊酯对茅山种群的触杀 LD₅₀ 为 $1.278 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{头}$, 对铜山种群的触杀 LD₅₀ 为

$3.699 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{头}$, 后者为前者的2.9倍; 氰戊菊酯对茅山种群的触杀 LD_{50} 为 $2.128 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{头}$, 对铜山种群的触杀 LD_{50} 为 $4.642 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{头}$, 后者为前者的2.1倍。从 b 值来看, 铜山种群的两条毒力曲线均稍大于茅山品系, 说明两地种群对这两种拟除虫菊酯类杀虫剂的反应存在差异, 但未上升到抗性水平。

表3 溴氰菊酯、氰戊菊酯的毒力比较

| 时间 | 药剂 | 种群 | 毒力回归曲线 | $\text{LD}_{50}(\mu\text{g}/\text{头})$ | 斜率 b | 相关系数 r | 抗性倍数 |
|-------------|------|----|----------------------|--|--------|----------|------|
| 4月 (上旬) | 溴氰菊酯 | 茅山 | $y = 6.921 + 0.664x$ | 1.278×10^{-3} | 0.664 | 0.992 | 2.9 |
| | | 铜山 | $y = 6.676 + 0.689x$ | 3.699×10^{-3} | 0.689 | 0.967 | |
| 11月 (上旬) | 氰戊菊酯 | 茅山 | $y = 8.417 + 2.054x$ | 2.218×10^{-2} | 2.054 | 0.994 | 2.1 |
| | | 铜山 | $y = 7.993 + 2.245x$ | 4.642×10^{-2} | 2.245 | 0.994 | |

句容县茅山东进林场自1978年以来, 马尾松毛虫一直保持低虫口密度, 未进行过任何化学防治。拟除虫菊酯类杀虫剂在我国应用于森林害虫的防治始于1981年后。在本文中溴氰菊酯和氰戊菊酯这两种拟除虫菊酯类杀虫剂, 对茅山种群的毒力回归线可视为敏感基线, 用来与用药时间长, 且次数较多的铜山种群毒力回归线进行比较。结果显示, 溴氰菊酯和氰戊菊酯的抗性指数均小于5。这表明, 铜山种群对溴氰菊酯和氰戊菊酯尚未形成抗性。

2.4 体壁对氰戊菊酯穿透的阻滞作用

昆虫体壁具有抵御外来物质侵入体内的作用。为了解马尾松毛虫对氰戊菊酯穿透的阻滞作用, 设计以下试验进行比较。

2.4.1 体壁点滴与皮下注射的毒力比较 对铜山、茅山两地种群分别进行体壁点滴和皮下注射毒力测定(表4)。表4中数据表明, 注射处理与点滴处理相比较, 能提高氰戊菊酯的毒力。说明体壁在马尾松毛虫的抗药性中, 起了屏障作用, 能阻止部分氰戊菊酯进入体内。比较茅山与铜山两地种群, 两者的 $\text{RTI}(\text{点滴 } \text{LD}_{50}/\text{注射 } \text{LD}_{50})$ 值均小于10, 且接近, 说明两地虫群体壁的耐药水平无异质性。

表4 氰戊菊酯点滴和注射处理的毒力影响比较

| 种群 | 处理方式 | 毒力回归曲线 | 斜率 b | 相关系数 r | $\text{LD}_{50}(\mu\text{g}/\text{头})$ | RTI |
|----|------|----------------------|--------|----------|--|-----|
| 茅山 | 点滴 | $y = 8.417 + 2.054x$ | 2.054 | 0.994 | 2.168×10^{-2} | 5.2 |
| | 注射 | $y = 8.032 + 1.273x$ | 1.273 | 0.988 | 4.154×10^{-3} | |
| 铜山 | 点滴 | $y = 7.993 + 2.245x$ | 2.245 | 0.994 | 4.642×10^{-2} | 4.7 |
| | 注射 | $y = 7.658 + 1.928x$ | 1.928 | 0.991 | 9.966×10^{-3} | |

2.4.2 氰戊菊酯在体壁中的穿透动态 用氰戊菊酯点滴马尾松毛虫3龄幼虫体表后的穿透动态, 从表5可看出, 点滴处理2 h内, 氰戊菊酯穿透体表的速率较大, 到2 h时, 有42.6%的量进入体内。以后穿透速率减缓, 曲线较平直, 到8 h时, 仍只有56.7%的量进入体内, 体表吸附量仍达43.3%。体壁中氰戊菊酯的滞留量, 初始则随时间上升, 1 h时滞留量达到最大, 为10.9%, 占体表穿透量的32.2%。以后体壁滞留量逐渐降低。8 h为1.8%, 仅占体表穿透量的2.8%。

表 5 氰戊菊酯在体表、体壁中的动态变化

| 处理时间(h) | 0 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 |
|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 体表附着量(μg) | 0.860 | 0.728 | 0.606 | 0.502 | 0.409 | 0.372 |
| 体表穿透率(%) | 13.3 | 29.5 | 42.6 | 52.4 | 56.7 | |
| 体壁滞留量(μg) | 0.014 | 0.095 | 0.036 | 0.026 | 0.016 | |
| 体壁滞留率(%) | 1.6 | 10.9 | 4.1 | 3.0 | 1.8 | |

活力最小, 为 $53.2 \times 10^{-2} \text{ mM/min}\cdot\text{g}$, 6 龄幼虫酯酶活力最大, 为 $82.3 \times 10^{-2} \text{ mM/min}\cdot\text{g}$, 3、4 龄幼虫酯酶活力较接近, 5、6 龄幼虫酯酶活力则增加较大。这一测试结果用来与氰戊菊酯对各龄幼虫的触杀毒力相比较, 我们可发现两者较为吻合, 表现了同一种趋势。

2.5.2 茅山、铜山两地种群酯酶活力 分别于1989年4月初及11月初对茅山种群和铜山种群4龄幼虫进行整体酯酶活力测定(见表7), 比较其结果: 两地种群在同一时期(同一世代、同一龄期)的酯酶活力无显著差异, 铜山种群酯酶活力较茅山种群稍大。与同时期两地种群对氰戊菊酯和溴氰菊酯的耐药力比较, 可看出酯酶活力与马尾松毛虫的耐药力有一定关系。

表 6 氰戊菊酯的毒力与酯酶活力关系

| 龄 期 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--|-------|-------|-------|-------|
| 酯 酶 活 力 ($10^{-2} \text{ mM/min}\cdot\text{g}$) | 53.2 | 57.7 | 79.6 | 82.3 |
| LD_{50} ($10^{-2} \mu\text{g}/\text{头}$) | 1.272 | 3.004 | 6.034 | 47.29 |

2.5 非专一性酯酶与抗药性的关系

非专一性酯酶作为一种解毒酶系, 在马尾松毛虫对氰戊菊酯的解毒过程中起了一定的作用。其作用大小是与酶活力大小相关联的。

2.5.1 一代各龄马尾松毛虫幼虫整体的酯酶活力 表6数据表明, 非专一性酯酶的活力是随龄期的增加而增大的, 3龄幼虫酯酶

表 7 溴氰菊酯、氰戊菊酯的毒力与酯酶活力关系

| 测定时间 | 种群 | 酯酶活力 ($10^{-2} \text{ mM}/\text{min}\cdot\text{g}$) | 药 剂 | LD_{50} ($\mu\text{g}/\text{头}$) |
|--------------|----|--|------|--|
| 4 月 (上旬) | 茅山 | 53.6 | 溴氰菊酯 | 1.278×10^{-3} |
| | 铜山 | 55.2 | | 3.699×10^{-3} |
| 11 月 (上旬) | 茅山 | 47.6 | 氰戊菊酯 | 2.168×10^{-2} |
| | 铜山 | 48.3 | | 4.619×10^{-2} |

3 结论与讨论

(1) 马尾松毛虫对氰戊菊酯的耐药力, 以每头试虫受药量计算随龄期的增加而增大。3龄幼虫最敏感, 6龄幼虫耐药力最大, 为3龄幼虫的37倍。若以单位体重受药量计算, 则3、4、5龄之间的耐药力差异消失。6龄幼虫的耐药力也只为3龄幼虫的4.5倍。本试验结果表明, 马尾松毛虫幼虫不同龄期之间耐药力差异较大, 耐药力随龄期的增加而增大。3、4龄幼虫对氰戊菊酯最敏感。选择对杀虫剂敏感的虫龄做为毒力测定的龄期固然是合理的, 但考虑到林间状态下, 马尾松毛虫3龄幼虫自然死亡率仍然较高, 4龄幼虫虫口密度较稳定这一因素, 马尾松毛虫的抗药性测定宜固定于4龄幼虫进行。

(2) 对茅山和铜山两地马尾松毛虫的毒力测定表明, 两地种群对溴氰菊酯、氰戊菊酯存在耐药力差异, 而受药时间长, 且次数较多的铜山种群耐药水平有增高的趋势, 但未形成抗药性。

(3) 通过氰戊菊酯点滴和注射处理茅山和铜山两地种群, 比较两者的RTI值, 两地种群体壁对氰戊菊酯表现出仅是自然耐药力的差异, 尚未形成明显的异质性差异。氰戊菊酯穿透

体壁的气相色谱分析则表明, 受药后8 h, 仍有43.3%的氰戊菊酯被阻止在体壁外, 进入体内的药量中有2.8%滞留于体壁中。由此可见, 马尾松毛虫体壁起了屏障作用, 影响了氰戊菊酯毒力的发挥, 在研究马尾松毛虫对氰戊菊酯的解毒机理时, 体壁所发挥的作用是不可忽视的, 值得进一步探讨。

(4) 构成抗性的机理之一是羧酸酯酶量的变化^[9]。马尾松毛虫不同龄期幼虫羧酸酯酶活力大小与其对氰戊菊酯的耐药力有关, 两者都随龄期的增加而增大, 铜山种群对溴氰菊酯的耐药力较茅山种群为大, 其酯酶活力也较茅山种群为大。这表明马尾松毛虫对氰戊菊酯耐药力的提高与体内羧酸酯酶活力的增加有关。说明酯酶在马尾松毛虫的解毒机制中起了一定的作用。

参 考 文 献

- 1 胡笑形. 拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性. 农药, 1986, 4, 27~29.
- 2 Anonymous. Second conference on methods for resistance in insects of agricultural importance: Standard method for detection of insecticide resistance (F.), Bull. Entomol. Soc. Am., 1970, 16, 147~153.
- 3 李周直, 朱正昌, 胡柏炯, 等. 松毛虫抗药性的测定方法. 森林病虫害综合防治文集, 1988, 245~251.
- 4 王荫长, 龚国玑, 陈长琨, 等. 昆虫生理生化实验技术. 南京农业大学, 1986.
- 5 Van Asperen K. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. J. Insect Physiol., 1962, 8, 401~416.
- 6 姜家良, 张朝远. 淡色库蚊幼虫对拟除虫菊酯抗性机理及其防治对策. 昆虫学研究集刊, 1985, 5, 105~111.

Studies on the Insecticide-Tolerance of Dendrolimus punctatus to Fenvalerate

Peng Longhui

Li Zhouzhi

(Jiangxi Agricultural University)

(Nanjing Forestry University)

Abstract The insecticide-tolerance of *Dendrolimus punctatus* Walker to fenvalerate was studied in Jiangshu Province through bioassay and the methods of physiology & biochemistry. The results showed that: ① The insecticide tolerance to fenvalerate increased with the increase of instars and it was 37 times in the 6th instar larvae more than that of the 3rd instar; ② The resistance to fenvalerate and deltamethrin had not formed yet in Tongshan colony; ③ The activity of carboxyesterase increased gradually with the increase of instars and was greater in Tongshan colony than that in Maoshan colony; ④ The results of dipping and injection showed less difference between the Tongshan and Maoshan colony. The dynamic study on pesticide-penetrating-cuticula of Tongshan colony showed that 43.3% fenvalerate did not entered cuticula, and that 1.8% fenvalerate remained in integument 8 hours after dipping the larvae.

Key words *Dendrolimus punctatus* fenvalerate deltamethrin insecticide-tolerance esterase