

瘤野螟 (*Cnaphalocrocis medinalis*) 對賽洛寧及培丹抗藥性及生化抗性機制之探討

余卿華、楊永裕*

屏東科技大學植物醫學系 91201屏東縣內埔鄉老埤村學府路1號

* 通訊作者，電子郵件：nasuta@mail2000.com.tw

摘 要

余卿華、楊永裕*。2018。瘤野螟 (*Cnaphalocrocis medinalis*) 對賽洛寧及培丹抗藥性及生化抗性機制之探討。植物醫學60(2): 15-22。

瘤野螟 (*Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée)) 在分類上屬於鱗翅目 (Lepidoptera)、草螟科 (Crambidae)，近年來在台灣成為二期稻的重要害蟲。目前防治此害蟲的方法以化學藥劑為主，但國外已有研究報告指出瘤野螟對約16種不同作用機制的殺蟲劑的抗藥性有上升的現象。本研究首先分析屏東長治及台南後壁兩地區的瘤野螟對八種殺蟲劑之抗藥性，結果顯示兩個族群皆對賽洛寧產生抗性，而長治族群則是在2014到2015年間對培丹抗性有上升的現象。為了解瘤野螟對賽洛寧及培丹產生的生化抗性機制，因此進行協力劑測試以確認是否有解毒酵素參與此害蟲對擬除蟲菊類殺蟲劑的代謝抗性，結果顯示在賽洛寧處理方面，兩族群在添加協力劑Piperonyl butoxide (PBO) 後協力比分別高達258及606.8；添加Diethyl maleate (DEM) 後協力比分別為1.743及5.389；添加Triphenyl phosphate (TPP) 後協力比分別為2.205及6.911。在培丹處理方面，只有長治族群在添加PBO後有協力效果 (協力比為3.636)。進一步分析不同濃度之賽洛寧及培丹處理下瘤野螟體內三種解毒酵素的活性變化，首先在賽洛寧方面，結果顯示長治族群的細胞色素P450單加氧酶 (Cytochrome P450 monooxygenase, P450) 活性只有在處理賽洛寧 1 µg/ml 時才顯著提高，然而酯酶 (Esterase, EST) 和麩胱甘肽轉移酶 (Glutathione-S-transferase, GST) 活性則是隨著賽洛寧濃度而提高；相較之下，後壁族群P450活性隨著藥劑濃度提高，但EST活性則是皆顯著降低。在培丹方面，結果顯示後壁族群的P450和EST兩者活性皆顯著降低。依據上述結果推測三種解毒酵素皆與瘤野螟代謝賽洛寧有關，其中以CYP450為主要代謝賽洛寧及培丹的解毒酵素，而且由PBO協力測試、P450解毒酵素活性結果皆顯示出與兩族群對賽洛寧的抗性程度差異有關。

關鍵詞：瘤野螟、抗性機制、協力劑、代謝解毒

緒 言

瘤野螟 (*Cnaphalocrocis medinalis*) 在分類上屬於鱗翅目 (Lepidoptera)、草螟科 (Crambidae)，分佈於東亞、東南亞、印度、澳洲、非洲等地。在1960年代原本是臺灣水稻上的次要害蟲，但自1970年後普遍發生^(1, 2)，為臺灣近年崛起的二期水稻重要的害蟲之一。瘤野螟一年有8個世代，一世代約30天，幼蟲用絲來進行捲葉藏匿其中所以又稱為稻縱捲葉蟲 (Rice leaf folder)。瘤野螟幼蟲啃食葉片上表皮，殘留長條白色斑紋，造成水稻植株光合作用顯著降低、葉綠素的損失及影響水分的平衡^(12, 13)，若無進行防治或防治不當，可能影響產量達18~24%⁽⁴⁾，單年二期稻作受害面積最高紀錄達3萬餘公頃⁽³⁾。為了更有效管理瘤野螟及其他水稻害蟲，我們針對推薦於水稻上之不同作用機制及不同防治對象的藥劑來測試瘤野螟的抗藥性，以避免交互抗性的產生。瘤野螟目前主要依賴化學防治管理，但有報告指出瘤野螟已經對約16種藥劑產生抗藥性，目前亞洲地區被發現可能產生抗藥性的有培丹 (cartap)、賽洛寧 (cyhalothrin) 及第滅寧 (Deltamethrin)^(5, 22)。

相關研究顯示，昆蟲對除蟲菊類藥劑 (pyrethroid) 產生代謝解毒的抗性機制與細胞色素P450單加氧酶 (Cytochrome P450 monooxygenase, P450)、酯酶 (Esterase, EST) 及麩胱甘肽轉移酶 (Glutathione-S-transferase, GST) 有關^(6, 17)，上述三種解毒酵素中以細胞色素P450單加氧酶為主要的解毒酵素，至今的研究表明昆蟲對除蟲菊類藥劑產生的抗藥性與CYP4、CYP6及CYP9基因家族的基因表現量有關^(9, 20)。

目前台灣尚無發表有關瘤野螟抗藥性機制之研究，因此本研究首先分析屏東及台南地區瘤野螟對現行推薦藥劑之抗藥性的程度。選擇屏東地區是因為過去沒有報告針對此地區瘤野螟的抗藥性進行研究，而選擇台南地區則是因為本試驗的後壁樣區是不噴藥的是有機農田，而且和屏東長治地區有一段距離，因此才特別比較這兩個地區瘤野螟對現行推薦藥劑的抗性差異。試驗結果顯示兩地區之瘤野螟對賽洛寧及培丹可能已產生抗藥性，因此進一步探討其產生抗藥性的機制，以作為未來在

水稻上施用藥劑的參考依據。

材料與方法

一、供試植物之栽培

供試水稻品系為台南11號水稻苗，育苗後進行暗處理3日，置於生長箱中晒菁 (28.5℃，光周期16 L：8 D) 一週後移至陽光下栽培，取約20cm高的苗進行藥劑試驗。

二、供試蟲源

分別自屏東縣長治鄉及台南市後壁區採集瘤野螟成蟲置於集蟲器或連葉採集幼蟲。成蟲飼養於壓克力透明飼養箱 (長35cm × 寬35cm × 高45cm)，以5%蔗糖水 (Sucrose) 餵食成蟲，並放置台南11號分蘗期水稻給予產卵，每日更換水稻植株。幼蟲飼養於壓克力盒 (長25cm × 寬15cm × 高5cm)，以水稻葉片飼養，上下層鋪紙巾保濕 (溫度25±1℃，60-70% R.H.；光周期16 L：8 D)。

三、藥品與分生試劑來源

第滅寧 (deltamethrin, 2.4% 水懸劑SC) 購自易利特開發有限公司；培丹 (Cartap hydrochloride, 6% 粒劑 GR) 購自好速化學股份有限公司；陶斯松 (Chlorpyrifos, 20.8% 乳劑EC) 購自惠光股份有限公司；芬普尼 (Fipronil, 4.95% 水懸劑SC) 購自台灣拜耳股份有限公司；賽洛寧 (lambda-Cyhalothrin, 2.46% 膠囊懸液CS)、剋安勃 (Chlorantraniliprole, 18.4% 水懸劑SC)、賽速安 (Thiamethoxam, 10% 水溶性粒劑SG)、賽速安勃 (Thiamethoxam + Chlorantraniliprole, 30% 水分散性粒劑 WG) 等四種殺蟲劑購自先正達股份有限公司；蔗糖購自 SigmaAldrich (Product of USA)、丙酮購自 Macron ((Product of USA), Triton X-100 還有90% piperonyl butoxide (PBO)、99% triphenyl phosphate (TPP) 及97% diethyl maleate (DEM) 這三種協力劑購自Acros Organic (Product of Belgium)。

EZLys™ tissue protein extraction reagent購自創世紀生物有限公司。用來做蛋白質定量的Bradford protein assay kit (Cat. No.: GPA102) 購自賽恩斯生物科技股份有限公司。p-introanisole及nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)，還有Glutathione S-Transferase (GST) (Cat No.: CS0410) assay kit購自SigmaAldrich (Product of USA)。

四、不同地區瘤野螟幼蟲對殺蟲劑之抗藥性

將來自屏東縣長治鄉及台南市後壁區農民田兩個地區水稻田之瘤野螟成蟲給予產卵，用20cm水稻苗以秧苗浸漬法進行生物檢測，毒性分析流程參考 Zhang *et al.*, 2014⁽²²⁾。將剋安勃、培丹、賽洛寧、第滅寧、陶斯松、芬普尼、賽速安及賽速安勃

等殺蟲劑，以RO水配製成不同濃度之測試溶液 (含0.01% Triton X-100)，總體積為100 ml，對照組則是含有0.01% Triton X-100之RO水溶液。在直徑9cm的透明圓形培養皿裡鋪濾紙並加入1.5ml的RO水，接著放進40片5cm之水稻苗葉片，最後挑入15隻二齡幼蟲，三重複，於72小時後觀察並記錄死亡蟲數。試驗數據以SPSS 17.0統計分析軟體之Probit 估算瘤野螟對各種藥劑的半數致死濃度 (Lethal Concentration 50%, LC₅₀)，95%信賴區間 (95% confidence) 及LC50迴歸直線的斜率。

五、瘤野螟代謝解毒酵素對賽洛寧之活性分析

(一) 添加協力劑之生物檢測

在分析PBO、TPP及DEM這三種協力劑對殺蟲劑的協力效果前，先進行協力劑對瘤野螟毒性的前試驗，測試瘤野螟二齡幼蟲對PBO (40, 80, 160 µg/ml)、DEM (50, 100, 200 µg/ml)、TPP (100, 200, 400 µg/ml) 之感受性，結果顯示80 µg/ml 的PBO、100 µg/ml 的DEM、200 µg/ml 的TPP對瘤野螟不會造成瘤野螟死亡，故使用這三個濃度做為協力分析時的最終測試濃度。將賽洛寧配製成不同的待測濃度，然後分別加入10 ml之PBO、DEM及TPP (內含0.01% Triton X-100)，總體積為100 ml，然後將來自長治及後壁之瘤野螟二齡幼蟲進行生物檢測，處理72小時後觀察並記錄幼蟲死亡數，各處理均重覆三次。

(二) 解毒酵素之活性測定

將來自屏東縣長治鄉及台南市後壁區農民田兩個地區水稻田之瘤野螟以上述方法進行生物檢測，處理72小時後取5隻瘤野螟三齡若蟲，加入250 µl EZLys™ tissue protein extraction reagent (BioVision, USA)，進行研磨使蟲體破碎釋出蛋白質，在4℃下、以8120 × g離心40分鐘，取上清液作為酵素活性分析之蛋白質溶液，每處理三重複。使用Bradford 法進行蛋白質定量，以 bovine serum albumin (BSA) 作為標準溶液，此方法利用Coomassie Brilliant Blue G-250會與蛋白質結合的特性，在G-250與蛋白質結合後，G-250的顏色會從紅色轉變成為藍色，即可於 595nm 測得此藍色複合物的吸光值訊號。解毒酵素之活性的分析包括以下三種：

1. 細胞色素P450單加氧酶(CYP450)活性測定

在1 ml塑膠比色管中加入400 µl 0.02 M NA-phosphate buffer (pH 7.4)、290 µl p-nitroanisole、10 µl Triphosphopyridine nucleotide, 10 µl NADPH 及100 µl 酵素源，然後利用分光光度計測定在波長405 nm下的吸光值，並以14.8 mM⁻¹ 的消光係數 (extinction coefficient, k) 計算產物生成量。

2. 酯酶(EST)活性測定

在1 ml塑膠比色管中加入575 µl 0.02 M NA-phosphate buffer

(pH 7.4)、10 μ l 酵素源及34.5 μ l 1.5 mM α -naphthyl acetate，於室溫下反應5分鐘後，以125 μ l 的3.5% FBBS (0.3% Fast blue b salt + 3.5% SDS) 顯色5分鐘，然後利用分光光度計測定在波長600 nm下的吸光值，並以9.25 mM⁻¹的消光係數計算產物生成量。

3. 麩胱甘肽轉移酶(GST)活性測定

在1 ml塑膠比色管加入980 μ l 的Dulbecco's phosphate buffered saline、10 μ l 200 mM L-Glutathione reduced、10 μ l 100 mM CDNB及20 μ l酵素萃取液在室溫下混勻延滯1分鐘，然後利用分光光度計測定在波長340 nm下，間隔30秒測一次，連續測5分鐘之吸光值，並以9.6 mM⁻¹的消光係數計算5分鐘吸光值的變化。

上述三類酵素活性的結果以 One way analysis of variance (ANOVA, P<0.05) 進行顯著性分析。

結 果

一、2014-2015年長治及後壁地區瘤野螟對推薦藥劑的抗藥性變化

為了調查在台灣之瘤野螟對推薦藥劑的抗藥性現況，因此在2014及2015年針對台南後壁及屏東長治地區的瘤野螟，分析這兩個地區的瘤野螟族群對植保手冊推薦在水稻上常用殺蟲劑的抗藥性調查。

剋安勃在2014年對長治及後壁地區瘤野螟之LC₅₀分別為0.392及 0.137 μ g/ml，LC₉₀分別為0.937 及0.701 μ g/ml，將LC₉₀與植保手冊推薦濃度175 μ g/ml相比，長治地區瘤野螟低186.766倍，而後壁地區瘤野螟低了249.643倍 (表一)；在2015年，LC₅₀分別為0.103 及 0.260 μ g/ml，LC₉₀濃度分別為1.056及1.091 μ g/ml，將LC₉₀與植保手冊推薦濃度175 μ g/ml相比，長治地區瘤野螟低 165.720 倍，而後壁地區瘤野螟低了 160.403 倍 (表二)；整體而言剋安勃仍可有效防治兩地區的瘤野螟。

培丹在2014年對長治及後壁地區瘤野螟之LC₅₀分別為99.992 及 163.102 μ g/ml，LC₉₀分別為186.809及705.243 μ g/ml，將LC₉₀與植保手冊推薦濃度417 μ g/ml相比，長治地區瘤野螟低了2.232倍，而後壁地區瘤野螟高了1.691倍 (表一)；在2015年，LC₅₀分別為 107.759 及 56.565 μ g/ml；LC₉₀分別為416.112 及 243.594 μ g/ml，將LC₉₀與植保手冊推薦濃度417 μ g/ml相比，長治地區瘤野螟已經接近推薦濃度，而後壁地區瘤野螟低了1.712倍 (表二)。

賽洛寧在2014年對長治及後壁地區瘤野螟之LC₅₀分別為0.104 及 9.877 μ g/ml，LC₉₀分別為4.227 及 32.472 pm，將LC₉₀與植保手冊推薦濃度12.3 μ g/ml相比，長治地區瘤野螟低了 2.910 倍，而後壁地區瘤野螟高了2.640倍 (表一)；在2015年，LC₅₀分別為 0.258 及 3.034 μ g/ml，其LC₉₀分別為 49.903 及 32.051 μ g/

表一、2014年長治及後壁地區瘤野螟對四種殺蟲劑之抗藥性分析

TABLE 1. Resistance of *C. medinalis* from Changjhih and Houbi to four insecticides in 2014

Insecticides	Location	LC ₅₀ (95% FL)	Slope (SEM)	LC ₉₀	Recommended concentration
Chlorantraniliprole	Changjhih	0.392 (0.274-1.054)	0.916(0.263)	0.937	175
	Houbi	0.137 (0.096-0.187)	1.574(0.315)	0.701	
Cartap	Changjhih	99.992((49.073-154.886)	1.323(0.685)	186.809	417
	Houbi	163.102(99.112-434.090)	1.113(0.632)	705.243	
Cyhalothrin	Changjhih	0.104(0.012-1.024)	0.784(0.745)	4.227	12.3
	Houbi	9.877(5.293-23.025)	1.092(0.385)	32.472	
Deltamethrin*	Houbi	99.625(37.403-635.555)	0.691(0.518)	946.826	13.33

* 單位為 (μ g/ml)

表二、2015年長治及後壁地區瘤野螟對八種殺蟲劑之抗藥性分析

TABLE 2. Resistance of *C. medinalis* from Changjhih and Houbi and Houbi to eight insecticides in 2015

Insecticides	Location	LC ₅₀ (95% FL)	Slope(SEM)	LC ₉₀	Recommended concentration
Chlorantraniliprole	Changjhih	0.103 (0.064-0.262)	0.972(0.554)	1.056	175
	Houbi	0.260 (0.124-0.458)	1.093(0.328)	1.092	
Cartap	Changjhih	107.759(84.173-142.152)	1.353(0.467)	416.112	417
	Houbi	56.565(27.733-65.129)	1.132(0.788)	243.594	
Cyhalothrin	Changjhih	0.258(0.107-0.595)	0.973(0.852)	49.903	12.3
	Houbi	3.034(2.116-4.191)	1.563(0.895)	32.051	
Deltamethrin	Changjhih	62.838(23.136-369.337)	0.693(0.792)	202.050	13.3
	Houbi	29.483(13.412-60.823)	1.013(0.437)	112.152	
Thiamethoxam	Changjhih	90.536(25.278-5142.609)	0.437(0.98*)	83058.041	2
	Houbi	306.628(252.27-396.820)	1.666(0.315)	720.949	
Thiamethoxam +Chlorantraniliprole	Changjhih	0.047(0.029-2.428)	0.885(0.791)	4.583	800
	Houbi	0.062(0.153-0.563)	0.893(0.764)	0.822	
Chlorpyrifos	Changjhih	52.295(39.298-86.630)	1.457(0.546)	393.352	300
	Houbi	52.526(41.410-61.088)	1.514(0.394)	114.802	
Fipronil	Changjhih	0.002(0.001-0.007)	0.743(0.792)	0.042	1.5
	Houbi	0.054(0.04-0.08)	1.312(0.376)	0.283	

* 單位為 (μ g/ml)

ml，將LC₉₀與植保手冊推薦濃度12.3 μ g/ml相比，長治地區瘤野螟高出4.057倍，而後壁地區瘤野螟高出2.606倍 (表二)；顯示賽洛寧對兩地區瘤野螟防治效果已下降。

第滅寧在2014年對後壁地區瘤野螟之LC₅₀為 99.625 μ g/ml，LC₉₀為 946.826 μ g/ml，將LC₉₀與植保手冊推薦濃度 13.3 μ g/ml相比，高出71.189倍，顯示在2014年第滅寧無法有效防治後壁地區瘤野螟 (表一)；在2015年第滅寧對長治及後壁地區瘤野螟，

LC₅₀分別為 62.838 及 29.483 µg/ml，LC₉₀濃度分別為 202.050 及 112.15 µg/ml，將LC₉₀與植保手冊推薦濃度 13.3 µg/ml相比，長治地區瘤野螟高出 15.192 倍，而後壁地區瘤野螟高出 8.432 倍 (表二)；整體而言從2014-2015年後壁地區瘤野螟對第滅寧抗藥性有上升的趨勢。

陶斯松在2015年對長治及後壁地區瘤野螟之LC₅₀分別為 52.295 及 52.526 µg/ml，LC₉₀分別為 393.352 及 114.802 µg/ml，將LC₉₀與植保手冊之推薦濃度 300 µg/ml相比，長治地區瘤野螟高出1.311倍，而後壁地區瘤野螟則低了 2.611 倍 (表二)，顯示陶斯松目前可能已無法有效防治長治地區瘤野螟，但可能仍對後壁地區瘤野螟有防治效果。

芬普尼在2015年對長治及後壁地區瘤野螟之LC₅₀分別為 0.002 及 0.054 µg/ml，兩地區的抗性比為27倍，LC₉₀分別為 0.042 及 0.283 µg/ml，將LC₉₀與植保手冊推薦濃度 1.5 µg/ml相比，長治地區瘤野螟低了 35.714 倍，而後壁地區瘤野螟低了 5.301倍 (表二)，顯示目前芬普尼仍可以有有效的防治兩個地區的瘤野螟。特別一提的是芬普尼 4.95% 雖然目前在台灣已禁用，目前只剩下粒劑 25%、0.3%可用於水稻，但因為本研究進行時 4.95% 芬普尼尚未禁用，而且只是在室內做毒效分析，目的只是配出需要的芬普尼濃度，並非進行田間瘤野螟防治試驗。

賽速安在2015年對長治及後壁地區瘤野螟之LC₅₀分別為 90.536 及 306.628 µg/ml，LC₉₀濃度分別為 83058.041 及 720.949 µg/ml，將LC₉₀與植保手冊推薦濃度25 µg/ml相比，長治地區瘤野螟高出 3322.322 倍，而後壁地區瘤野螟高出 28.838 倍 (表二)，顯示賽速安無法防治兩地區的瘤野螟。

賽速安勃在2015年對長治及後壁地區瘤野螟之LC₅₀分別為 0.047 及 0.062 µg/ml，LC₉₀分別為 4.583 及 0.822 µg/ml，與植保手冊推薦濃度800 µg/ml相比，長治地區瘤野螟低了 174.558 倍，而後壁地區瘤野螟低了 973.236 倍 (表二)，顯示賽速安勃可以有效防治兩地區的瘤野螟。與賽速安的結果比較可知賽速安勃的對瘤野螟的良好毒效應是混劑中之剋安勃的貢獻。

二、瘤野螟對殺蟲劑生化抗性機制的探討

(一) 協力劑測試

為了找出瘤野螟對賽洛寧及培丹產生代謝型抗藥性的原因，將賽洛寧及培丹分別添加PBO、TPP及DEM之協力分析測試，來探討瘤野螟體內解毒酵素對瘤野螟產生抗藥性所扮演的角色。

1. 培丹添加協力劑之測試

測試前培丹對長治及後壁地區瘤野螟之LC₅₀分別為107.759 及56.570 µg/ml，添加協力劑PBO、TPP及DEM後，長治地區瘤野螟LC₅₀分別為29.632、93.791及79.960 µg/ml，協力比分別為 3.637、1.149及1.348倍，後壁地區瘤野螟LC₅₀分別為51.392、88.904及73.922 µg/ml，協力比分別為1.101、0.636及0.765倍，顯示P450可能參與長治地區瘤野螟對培丹的部分解毒代謝作用，而EST與GST與長治地區瘤野螟對培丹產生抗藥性無關；

後壁地區瘤野螟添加TPP及DEM後顯示抗藥性上升，表示三種解毒酵素皆不是後壁地區瘤野螟對培丹產生抗藥性的原因 (表三)。

表三、瘤野螟添加三種協力劑後之培丹協力效果分析

TABLE 3. Synergism of cartap with three synergists to *C. medinalis* in Changjhih and Houbi

Location	Insecticides	LC ₅₀ [*] (95%FL)	SR ⁺
Changjhih	Cartap	107.759 (84.173-142.152)	-
	Cartap+PBO	29.632(17.675-69.278)-	3.637
	Cartap+TPP	93.791(61.51-145.35)	1.149
	Cartap+DEM	79.960(46.828-101.817)	1.348
Houbi	Cartap	56.571(27.730-65.128)	-
	Cartap+PBO	51.392(43.683-97.517)	1.101
	Cartap+TPP	88.904(55.324-120.195)	0.636
	Cartap+DEM	73.929(51.399-101.268)	0.765

^{*} 單位為 (µg/ml)

⁺SR (Synergism Ratio) = LC₅₀ without synergist / LC₅₀ with synergist.

2. 賽洛寧添加協力劑之測試

測試前賽洛寧對長治及後壁地區瘤野螟之LC₅₀分別為0.258 及3.034 µg/ml，添加協力劑PBO、TPP及DEM後，長治地區瘤野螟LC₅₀濃度分別為0.001、0.148及0.117 µg/ml，協力比分別為258、1.743及2.205倍，後壁地區瘤野螟LC₅₀濃度分別為0.005、0.563及0.439 µg/ml，協力比分別為606.8、5.389及6.911倍，添加PBO的賽洛寧對兩地區的瘤野螟致死效果皆大幅增強，顯示被PBO所抑制的P450可能為兩地區瘤野螟參與對賽洛寧代謝解毒的主要酵素，而EST與GST可能也參與其中，扮演對賽洛寧部分的代謝解毒作用。比較兩族群結果顯示後壁族群三種協力劑的協力效果，可能為後壁族群對賽洛寧抗藥性較高之原因 (表四)。

(二) 解毒酵素活性分析

結果顯示，長治地區瘤野螟處理不同濃度 (0、50、100、200 µg/ml) 培丹72小時後的P450活性分別為1.40、1.23、1.04及0.70 (µmol / min / mg)，不同濃度間皆無顯著性差異；EST活性分別為47.22、54.50、43.82及30.15 (µmol / min / mg)，不同濃度間也是皆無顯著性差異；GST活性分別為21.00、62.48、44.84及12.91 (µmol / min / mg)，處理培丹50 µg/ml時GST活性顯著的被誘導，但之後隨著濃度增加活性逐漸下降。後壁地區瘤野螟處理0、50、100、200 µg/ml 培丹72小時後的P450活性分別為2.20、0.78、0.90及0.39 (µmol / min / mg)，與對照組有顯著性差異。處理培丹後P450活性皆顯著下降，酯酶活性分別為97.46、53.06、27.06及31.79 (µmol / min / mg)，皆無顯著性差異。GST活性分別為65.69、59.69、54.46及73.93 (µmol / min / mg)，不

表四、瘤野螟添加三種協力劑後之賽洛寧協力效果分析

TABLE 4. Synergism of cyhalothrin with three synergists to *C. medinalis* in Changjhih and Houbi

Location	Insecticides	LC ₅₀ ^a (95%FL)	SR ⁺
Changjhih	Cyhalothrin	0.258(0.113-0.606)	-
	Cyhalothrin+PBO	0.001(0.0002-0.003)	258
	Cyhalothrin+TPP	0.148(0.042-0.459)	1.743
	Cyhalothrin+DEM	0.117 (0.022-1.092)	2.205
Houbi	Cyhalothrin	3.034(2.125-4.194)	-
	Cyhalothrin+PBO	0.005(0.002-0.009)	606.8
	Cyhalothrin+TPP	0.563(0.117-1.293)	5.389
	Cyhalothrin+DEM	0.439(0.193-0.845)	6.911

^a 單位為 (μg/ml)⁺SR (Synergism Ratio) = LC₅₀ without synergist / LC₅₀ with synergist.

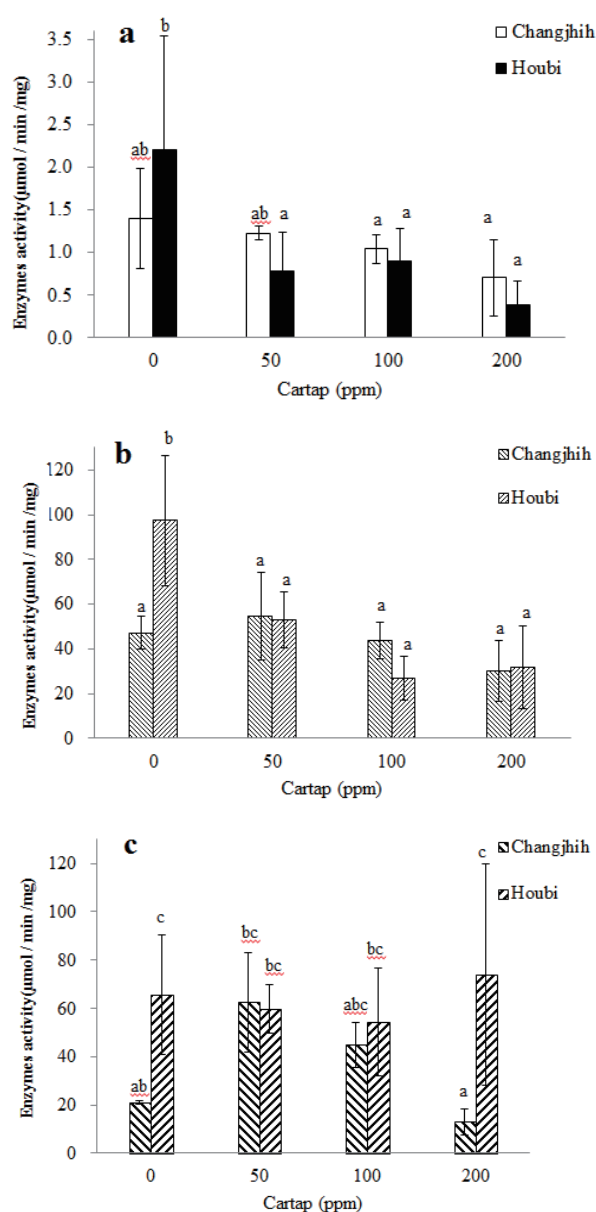
同濃度間皆無顯著性差異 (圖一)。未處理藥劑的後壁族群其P450、EST及GST活性皆顯著高於長治地區瘤野螟，但協力測試結果顯示長治族群的協力比高於後壁族群，故推測瘤野螟在代謝培丹的功能上解毒酵素並非主要角色。

將採集來自長治及後壁地區瘤野螟處理不同濃度賽洛寧，取活蟲進行測定解毒酵素活性，結果顯示長治地區瘤野螟處理0、0.01、0.1、1、10 μg/ml 後72小時的P450活性分別為1.40、1.10、1.53、2.61及1.43 (μmol / min / mg)，僅處理賽洛寧1 μg/ml 後P450活性顯著較對組照高，酯酶活性分別為47.22、85.78、79.94、101.43及157.05 (μmol / min / mg)，酯酶活性隨著賽洛寧濃度提高而顯著上升，GST活性分別為21.00、9.55、18.73、32.03及47.70，GST活性整體趨勢隨賽洛寧濃度提高而上升 (圖二)；後壁地區瘤野螟處理0、1、2、5、10 μg/ml 後72小時的P450活性分別為2.20、0.57、0.82、1.02及4.01 (μmol / min / mg)，處理賽洛寧1、2、5 μg/ml後P450活性逐步提升，至10 μg/ml後P450活性顯著提高，而酯酶活性分別為97.46、29.94、43.91、37.64及45.91 (μmol / min / mg)，處理四個濃度後酯酶活性皆有下降的趨勢，GST活性分別為65.69、53.78、50.90、51.63及72.64，皆無顯著差異 (圖六)；顯示兩地區瘤野螟在對賽洛寧的代謝解毒作用中，三種解毒酵素都有參與，而未處理藥劑的後壁族群其CYP450、EST及GST活性皆顯著高於長治地區瘤野螟，分別高出1.57、2.06及3.13倍，故此因素可能也是後壁族群較長治族群對賽洛寧具抗性之原因 (圖二、三)。

討 論

一、2014-2015年長治及後壁地區瘤野螟對推薦藥劑的抗藥性變化

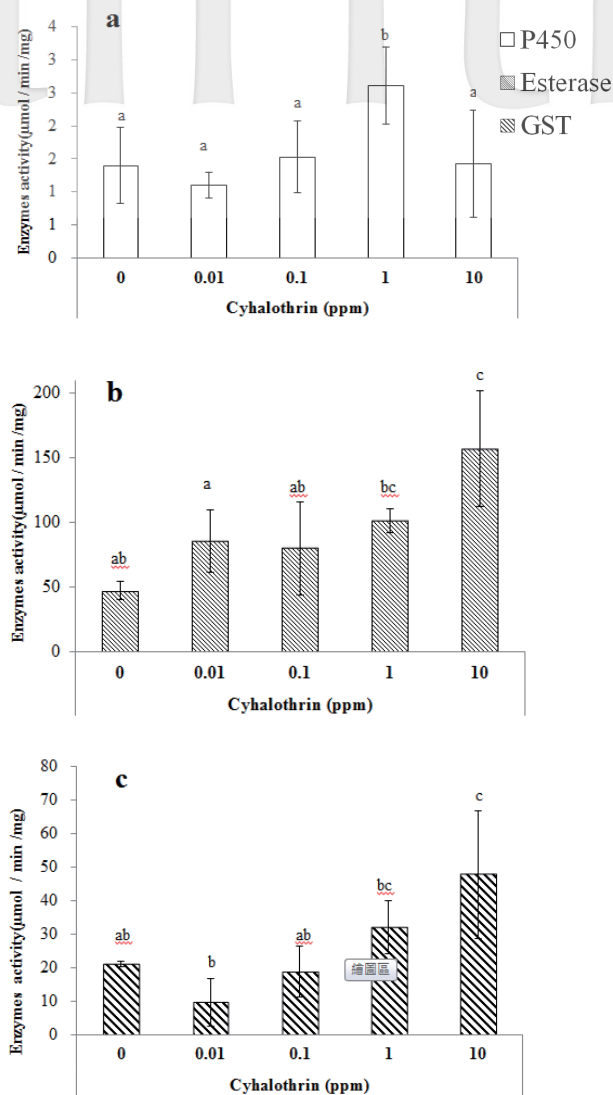
廖等 (2006)⁽²⁾ 防治藥劑以2.8%賽洛寧乳劑2,000倍 (14 μg/



圖一、添加不同濃度培丹後長治及後壁地區瘤野螟之解毒酵素 (a) 細胞色素P450單加氧酶 (b) 酯酶 (c) 麩胱甘肽轉移酶活性的變化。不同字母代表多變異分析有顯著性差異。

Fig. 1. Detoxification enzymes activity of *C. medinalis* treated with different concentrations of cartap in Changjhih and Houbi. (a) P450 activity ; (b) EST activity ; (c) GST activity. Different letters on the error bars indicate the significant differences by ANOVA analysis ($p < 0.05$).

ml) 對台中烏日地區瘤野螟成蛾發生盛期後 7 天施藥，14 天後 (約2齡幼蟲) 調查結果顯示防治效果高達95%。戴 (2012)⁽⁵⁾ 調查台南後壁及台中霧峰地區瘤野螟對芬普尼、陶斯松、賽洛寧及第滅寧四種推薦藥劑的抗藥性，結果顯示陶斯松對兩個族群 LC₅₀皆小於20 μg/ml；賽洛寧對霧峰族群的LC₅₀接近20 μg/ml，對後壁族群的LC50接近60 μg/ml；第滅寧對霧峰族群的 LC₅₀大

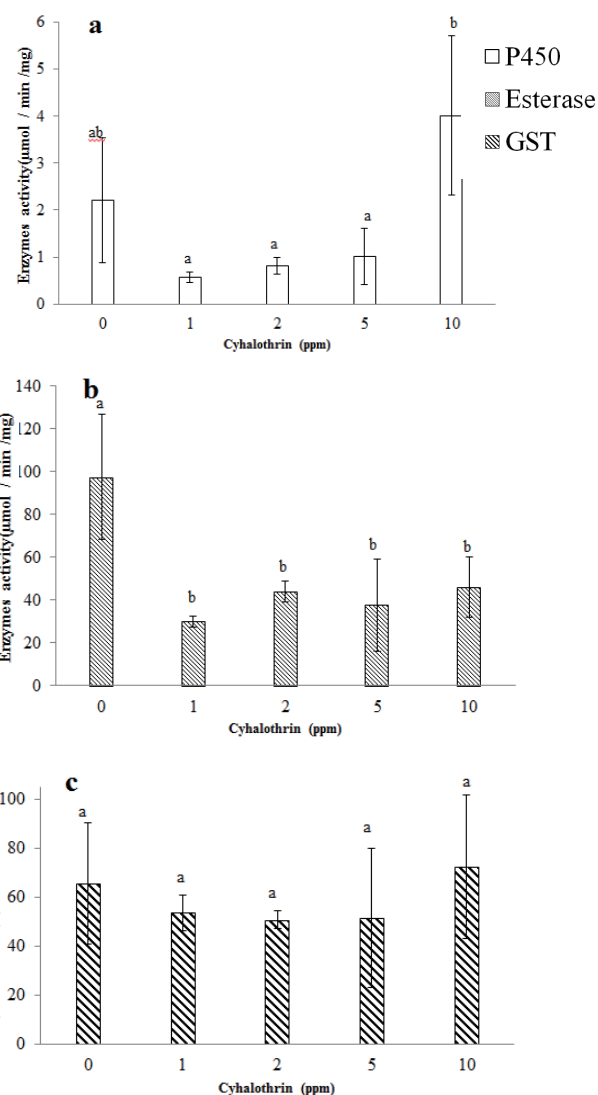


圖二、添加不同濃度賽洛寧後長治地區瘤野螟之解毒酵素 (a) 細胞色素 P450 單加氧酶 (b) 酯酶 (c) 麩胱甘肽轉移酶活性的變化。不同字母代表多變異分析有顯著性差異。

Fig. 2. Detoxification enzymes activity of *C. medinalis* treated with different concentrations of cyhalothrin in Changjiah. (a) P450 activity ; (b) EST activity ; (c) GST activity. Different letters on the error bars indicate the significant differences by ANOVA analysis ($p < 0.05$).

於 120 μg/ml。相比較下，本研究也調查後壁地區瘤野螟的抗藥性， LC_{50} 結果顯示在 2009 年到 2015 年期間瘤野螟對陶斯松抗藥性上升了約 2.5 倍；後壁地區瘤野螟從 2009 年到 2015 年期間對屬於除蟲菊類藥劑的賽洛寧與第滅寧之抗藥性有逐漸上升的趨勢，賽洛寧下降約 19 倍⁽⁵⁾。雖然不確定本研究所採樣的後壁瘤野螟族群與戴 (2012)⁽⁵⁾ 中的族群是否來自同一塊田，但由於瘤野螟的移動性不低，因此將兩篇研究視為同一族群討論。

在中國大陸的研究方面⁽²²⁾，從 2011 年到 2013 年間中國之南寧、長江及南京地區三個地區的瘤野螟對剋安勃抗藥性皆



圖三、添加不同濃度賽洛寧後後壁地區瘤野螟之解毒酵素 (a) 細胞色素 P450 單加氧酶 (b) 酯酶 (c) 麩胱甘肽轉移酶活性的變化。不同字母代表多變異分析有顯著性差異。

Fig. 3. Detoxification enzymes activity of *C. medinalis* treated with different concentrations of cyhalothrin in Houbi. (a) P450 activity ; (b) EST activity ; (c) GST activity. Different letters on the error bars indicate the significant differences by ANOVA analysis ($p < 0.05$).

上升， LC_{50} 分別為 0.955-3.165、0.713- 1.453、1.404-3.099 μg/ml；長江及南京地區的瘤野螟對 Monosultap (與培丹作用機制相同) 的抗藥性上升， LC_{50} 分別為 115.9-510.5、150.5-597.2 g/ml，而南寧地區瘤野螟對培丹則有逐漸下降的趨勢， LC_{50} 為 330.9-167.9 μg/ml；南京地區的瘤野螟對陶斯松抗藥性也有逐漸上升的趨勢， LC_{50} 為 3.481-0.833 μg/ml⁽²²⁾。而本次在 2014-2015 年間調查結果顯示長治族群瘤野螟對剋安勃抗藥性下降，後壁族群則抗藥性則上升，比較下 LC_{50} 比中國地區低；長治族群對培丹抗藥性有輕微上升的趨勢，而後壁族群抗藥性則有

下降的趨勢，但調查指出2006-2007年水稻害蟲二化螟 (*Chilo suppressalis*) 對培丹結果顯示產生約61倍的抗藥性⁽⁷⁾，因此還是要謹慎使用培丹以避免瘤野螟對此殺蟲劑產生抗藥性；由於本試驗毒效分析的方法就是參考上述大陸研究的方法，因此可推論屏東與台南兩族群對陶斯松抗藥性比中國地區瘤野螟高(表一、二)。

二、瘤野螟對殺蟲劑生化抗性機制的探討

(一) 協力劑測試及解毒酵素活性分析

1. 賽洛寧添加協力劑之效果及解毒酵素活性分析

長治及後壁地區瘤野螟處理賽洛寧結果推論長治及後壁地區瘤野螟對賽洛寧產生抗性主要與細胞色素P450有關。在其它鱗翅目的研究方面，Martin *et al.* (2002)⁽¹³⁾ 對感性及抗擬除蟲菊品系番茄夜蛾 (*H. armigera*) 處理第滅寧及添加PBO結果顯示協力比分別為1.3及54倍；El-Latif *et al.* (2014)⁽⁸⁾ 及Rodrigues *et al.* (2014)⁽¹⁸⁾ 的研究結果也都顯示昆蟲對擬除蟲菊類藥劑產生抗性與細胞色素P450有關。

在其它解毒酵素方面，Xi *et al.* (2015)⁽²¹⁾ 對感性 (CSS) 及抗性 (CRR) 品系大豆蚜 (*A. glycine*) 處理賽洛寧後分別添加PBO、TPP及DEF後，CSS品系的協力比分別為3、0.26及0.25倍，CRR品系的協力比分別為40.59、5.85及23倍，顯示酯酶也可能與大豆蚜對賽洛寧產生抗性有相關；而Muthusamy *et al.* (2011)⁽¹⁴⁾ 則指出斜紋夜蛾 (*S. litura*) 對擬除蟲菊類殺蟲劑賽洛寧的解毒作用與酯酶有相關。

本研究分析處理不同濃度賽洛寧後瘤野螟三種解毒酵素的活性，結果顯示長治地區瘤野螟的細胞色素P450活性在處理賽洛寧1 µg/ml顯著提高，酯酶活性隨著賽洛寧濃度而提高；後壁地區瘤野螟細胞色素P450活性隨著藥劑濃度提高，酯酶活性皆顯著低於未處理藥劑的對照組 (圖二、三)。El-Latif *et al.* (2014)⁽⁸⁾ 將抗性擬除蟲菊藥劑的番茄夜蛾 (Nagpur和 Delhi兩品系) 處理PBO後，其細胞色素P450活性比感性品系高出2.40和1.79倍；Xi *et al.* (2015)⁽²¹⁾ 也指出細胞色素P450及酯酶活性增強讓大豆蚜 (*A. glycine*) 對賽洛寧產生抗性。本實驗長治族群在處理賽洛寧後GST活性隨著賽洛寧濃度而提高，與Muthusamy *et al.* (2013)⁽¹⁵⁾ 研究報告顯示將花生燈蛾 (*A. albistriga*) 處理賽洛寧後GST活性顯著的提高的結果相符，但後壁族群GST則無顯著性變化。以上結果證實了被PBO所抑制的細胞色素P450為瘤野螟代謝賽洛寧的主要解毒酵素，被TPP及DEM抑制的酯酶及GST也有參與代謝解毒作用，因為TPP及DEM之協力效果較沒有PBO的協力效果高，推測為次要 (minor) 解毒酵素。

2. 培丹添加協力劑之效果及解毒酵素活性分析

Siqueira *et al.* (2000)⁽¹⁹⁾ 研究報告顯示將番茄斑潛蛾 (*Tuta absoluta*) 處理培丹及PBO後協力比能高達21.06，指出細胞色素P450可能為番茄斑潛蛾對培丹產生抗藥性的主要解毒酵素，與本實驗結果相比，長治族群的協力結果與Siqueira *et al.* (2000)

⁽¹⁹⁾ 相符，Han *et al.* (2003)⁽¹⁰⁾ 研究指出抗Monosultap品系的二化螟 (*C. suppressalis*) 之多功能氧化酶活性比感性品系高出3.3倍，酯酶及GST活性則無顯著差異，本研究協力效果顯示被PBO所抑制的細胞色素P450可能為參與長治地區瘤野螟代謝賽洛寧的解毒酵素，但具有協力效果的長治族群由處理不同濃度培丹後測試其細胞色素P450酵素活性分析結果顯示並無顯著性差異，而無協力效果的後壁族群在處理培丹後，其酵素活性皆有顯著性下降，因此解毒酵素活性結果與協力效果並無發現有相符，整體與Han *et al.* (2003)⁽¹⁰⁾ 分析的酵素活性結果不同。

除了培丹和賽洛寧之外，Muthusamy *et al.* (2014)⁽¹⁶⁾ 研究報告中比較斜紋夜蛾 (*Spodoptera litura*) 對剋安勃之抗性及感性品系添加PBO、TPP及DEM後的解毒酵素活性，結果顯示抗性品系的三種解毒酵素活性皆高於感性品系。

整體而言，不同藥劑的協力比調查與解毒酵素活性分析的結果關聯性沒有那麼強。推測可能在解毒酵素的抗性機制之外，或許仍有其他的神經受體突變所導致的抗性，這有待後續進一步的研究釐清此推論。

引用文獻

1. 黃守宏、鄭清煥、陳秋男、吳文哲。2009。台灣水稻害蟲發生趨勢與防治展望。台灣水稻保護成果與新展望研討會專刊 131-147。
2. 廖君達、林金樹、陳啟吉。2006。瘤野螟族群消長、防治適期及水稻品種抗性。臺中區農業改良場研究彙報 91: 31-38。
3. 鄭清煥。1987。嘉南地區瘤野螟之生態觀察。植保會刊 29: 135-146。
4. 顏福成。1981。水稻瘤野螟之發生及防治適期研究。臺南農改場研究彙報 15: 81-93。
5. 戴淑美。2012。水稻害蟲之抗藥性。農業世界 345: 21-29。
6. Casida, J. E. 1970. Mixed-function oxidase involvement in the biochemistry of insecticide synergists. J. Agricult. Food Chem. 18: 753-772.
7. Cheng, X., Chang, C. and Dai, S. M. 2010. Responses of striped stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae), from Taiwan to a range of insecticides. Pest Manag. Sci. 66: 762-766.
8. El-Latif, A. O. A., Kranthi, K. R., Kranthi, S., Sarwar, A., and Subrahmanyam, B. 2014. Overexpression of cytochrome P450 *CYP6B7* mediated pyrethroid resistance in Indian strains of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner). J. Plant Prot. Res. 54: 287-293.
9. Gong, Y., Li, T., Zhang, L., Gao, X. and Liu, N. 2013. Permethrin Induction of Multiple Cytochrome P450 Genes in Insecticide Resistant Mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. Int. J. Biol. Sci. 9: 863-871.

10. Han, Z. J., Han, Z. J., Wang, Y. C. and Chen, C. K. 2003. Biochemical features of a resistant population of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker). Acta Entomol. Sinica 46: 161-170.
11. Islam, Z. and Karim, A. N. M. R. 1997. Leaf folding behaviour of *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) and *Marasmia patnalis* Bradley, and the influence of rice leaf morphology on damage incidence. Crop Prot 16: 215-220.
12. Jong, P. D. 1992. Effect of folding and feeding by *Cnaphalocrocis medinalis* on photosynthesis and transpiration of rice leaves. Entomol. Exp. Appl. 63: 101-102.
13. Martin, T., Chandre, F., Ochoa, G., Vaissayre, M. and Fournier, D. 2002. Pyrethroid resistance mechanisms in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from West Africa. Pestic. Biochem. Physiol. 74: 17-26.
14. Muthusamy, Shivakumar, Karthi, and Ramkumar. 2011. Pesticide detoxifying mechanism in field population of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: noctuidae) from South India. Egypt. Acad. J. Biol. Sci. 3: 51-57.
15. Muthusamy, R., Suganya, R., Gowri, M. and Shivakumar, M. 2013. Biochemical mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in red hairy caterpillar *Amsacta albistriga* (Lepidoptera: Arctiidae). J. Saudi. Society of Agric. Sci. 12: 47-52.
16. Muthusamy, R., Vishnupriya, M. and Shivakumar, M. S. 2014. Biochemical mechanism of chlorantraniliprole resistance in *Spodoptera litura* (Fab) (Lepidoptera: Noctuidae). J. Asia-Pac Entomol. 17: 865-869.
17. Plapp Jr, F. W., Bigley, W. S., Chapmen, G. A. and Eddy, G. W. 1963. Synergism of Malathion Against Resistant House Flies and Mosquitoes. J. Econ. Entomol. 56: 643-649.
18. Rodrigues, A. R., Siqueira, H. A. and Torres, J. B. 2014. Enzymes mediating resistance to lambda-cyhalothrin in *Eriopsis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae). Pest Biochem. Physiol. 110: 36-43.
19. Siqueira, H. A. A., Guedes, R. N. C. and Picanco, M. C. 2000. Cartap resistance and synergism in populations of *Tuta absoluta* (Lep., Gelechiidae). J. Appl. Ent. 124: 233 - 238.
20. Wang, W., Lv, Y., Fang, Hong, S., Guo, Q., Hu, S., Zou, F., Shi, L., Lei, Z., Ma, K., Zhou, D., Zhang, D., Sun, Y., Ma, L., Shen, B. and Zhu, C. 2015. Identification of proteins associated with pyrethroid resistance by iTRAQ-based quantitative proteomic analysis in *Culex pipiens pallens*. Parasit. Vectors. 8: 95.
21. Xi, J., Pan, Y., Bi, R., Gao, X., Chen, X., Peng, T., Zhang, M., Zhang, H., Hu, X. and Shang, Q. 2015. Elevated expression of esterase and cytochrome P450 are related with lambda - cyhalothrin resistance and lead to cross resistance in *Aphis glycines* Matsumura. Pestic. Biochem. Physiol. 118: 77-81.
22. Zhang, S. K., Ren, X. B., Wang, Y. C. and Su J. 2014. Resistance in *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae) to new chemistry insecticides. J. Econ. Entomol. 107: 815-820.

ABSTRACT

Yu, C.-H., and Yang, Y.-Y.* Insecticides resistance and biochemical resistance mechanism to cyhalothrin and cartap in rice leaf folder *Cnaphalocrocis medinalis*. J. Plant Med. 60(2): 15-22.

*Corresponding author, Y. Y. Yang, E-mail: nasuta@mail2000.com.tw

In recent years, *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae) become an important pest on the rice of second phase in Taiwan. Application of insecticides was the main method to control this insect, but the resistance to various kinds of insecticides has been documented in Taiwan and other countries. This study investigated the resistance of *C. medinalis* from Changjhih and Houbi to eight insecticides. The results showed that both populations developed resistance to cyhalothrin, and the Changjhih population showed additional resistance to cartap. The synergist test was used to determine whether detoxification enzymes were involved in the metabolic resistance to cyhalothrin and cartap. When *C. medinalis* of Changjhih and Houbi populations were treated with cyhalothrin and three synergists individually, these two populations synergistic ratio of 285 and 606.8 for piperonyl butoxide (PBO), 1.74 and 5.4 for Diethyl maleate (DEM), 2.21 and 7.53 for Triphenyl phosphate (TPP), respectively. In addition, synergism of cartap and PBO was observed in Changzhi population, and the synergistic ratio was 3.64. Further analysis about detoxification enzymes activity treated with cyhalothrin or cartap at different concentrations for *C. medinalis*, biochemical assay showed cytochrome P450 (P450) activity increased significantly for Changzhi population after exposure 1 µg/ml cyhalothrin, however, the degree of Esterase (EST) and Glutathione-S- transferase (GST) activity increased at higher concentration of cyhalothrin. Besides, elevation of CYP450 activity of Houbi population with the concentration increasing, but EST activity was significantly reduced. The result showed P450 and EST activity significantly decreased in Houbi population after exposure to cartap. Above results concluded all three kinds of detoxification enzymes are involved in metabolism of cyhalothrin for *C. medinalis*, and cytochrome P450 is the major detoxification enzyme in the metabolism of cyhalothrin and Cartap. Overall results showed degrees of difference of cyhalothrin resistance from two population might appear correlation with synergistic test by the PBO.

Keywords: *Cnaphalocrocis medinalis*, resistance mechanisms, synergists, metabolic detoxification.