

增效剂 NIA16388 对溴氰菊酯增效机理的研究

何运转¹ 李梅² 何凤琴² 冯国蕾² 王荫长³

¹ 河北农业大学昆虫化保系, 保定 071001;

² 中国科学院动物研究所, 北京 100080;

³ 南京农业大学植保系, 南京 210095)

摘 要 以抗溴氰菊酯品系家蝇(Del-R)为试材, 测定了NIA对溴氰菊酯的增效作用, 结果表明: NIA对溴氰菊酯有极显著的增效作用。此后对NIA的增效机理进行了研究, 实验证明: NIA可抑制家蝇体内羧酸酯酶的活性, I_{50} 值分别为 $2.14(\pm 0.22) \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (α -NA) 和 $1.09(\pm 0.39) \times 10^{-9} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (β -NA), NIA为 $4.20 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 其对多功能氧化酶的抑制率达 $78.63(\pm 0.13)\%$; 此外, NIA对神经靶标部位的AChE也有抑制作用, I_{50} 值为 $2.37(\pm 0.69) \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。几方面综合作用的结果, 使其表现出明显的增效效果。

关键词 NIA16388; 增效机制; 溴氰菊酯

拟除虫菊酯类杀虫剂以其高效、低毒、低残留等特点倍受人们的青睐。世界各地已广泛将其应用于农、林、牧及卫生害虫的防治, 且取得了极好的防治效果, 达到预防疾病、确保增产的目的, 但随之而来的是, 许多害虫已对其产生了抗药性, 导致防治的失败。增效剂的使用是克服抗性、延长现有农药使用寿命的重要手段之一。

NIA16388(简称NIA), 是一种不对称的有机磷酸酯类化合物, 国内外许多学者曾报道, NIA对各种类型的杀虫剂均有明显的增效作用^[1-6], 但对其增效机制却说法不一。Nishimura等^[5,6]认为, NIA主要通过抑制水解代谢而起到增效作用; Pap^[7]、Nicholson^[8]、Miyamoto^[9]则认为, NIA可能是通过对酯酶及氧化酶的抑制而增效的。这些结果都是通过生测比较间接推测而来, 并没有直接验证NIA对体内各种酶系的抑制作用。为确定NIA的使用范围, 更好地发挥其增效作用, 对NIA的增效机制有必要进行深入研究, 作者以Del-R品系家蝇为试材, 对NIA的增效机理进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 供试昆虫

家蝇敏感品系(SP), 引自美国Texas A & M大学昆虫系Plapp教授实验室, 未接触过任何杀虫剂; 抗溴氰菊酯品系(Del-R), 1983年采自使用法国罗索·优克福(Roussel-Uclaf Group)公司产品Kothrin的养鸭场, 室内用溴氰菊酯进行筛选培育, 现抗性已达10万倍左右。

1.2 药剂

NIA16388, 纯度为90%(中国科学院上海昆虫所泰兴实验厂提供); 增效磷(SV1), 室内进行重蒸, 含量大于95%(山东乐陵农药厂提供); 溴氰菊酯(deltamethrin), 纯度为99%(法国罗索·优克福公司产品)。

□ 通讯联系人: 何运转, 女, 35岁, 博士, 副教授; 电话: 0312-2091786

1.3 试剂

α -和 β -乙酸萘酯 (α -NA, β -NA) (北京试剂厂出品); α -和 β -萘酚, 分析纯 (北京试剂厂出品); 对硝基苯甲醚 (NTAN), 室内进行重蒸 (北京化工厂产品); 对硝基苯酚 (NTPH), 重结晶 (北京理工大学宏宇化工公司产品); 碘化硫代乙酰胆碱 (ATCh), 含量 99% (ROTH 公司产品); 5, 5'-二巯基-2, 2'-二硝基苯甲酸 (DTNB) (Fluka 公司产品); 辅酶 II (NADPH), 含量大于 98% (Sigma 公司产品); 固兰 RR 盐 (Fluka 公司产品); 十二烷基硫酸钠 (SDS) (Merck 公司产品); 水杨酸毒扁豆碱 (eserine) (Wellcome Foundation Ltd 产品); 三氯甲烷、NaOH、 Na_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 等试剂均为市售分析纯。

1.4 增效试验

用 0.93 μL 的点滴管, 将一定浓度的增效剂 (用丙酮稀释) 点于羽化后 4~5 d 的雌蝇腹部, 待 1 h 后, 再进行杀虫剂的毒力测定。24 h 后, 检查死亡率, 在计算机上用 polo 程序^[10]求出 LD_{50} 值, 然后求出增效比 SR 值。

$$\text{SR} = \text{LD}_{50}(\text{杀虫剂}) / \text{LD}_{50}(\text{杀虫剂} + \text{增效剂})$$

1.5 NIA 对羧酸酯酶的抑制作用

1.5.1 酶源制备 取羽化后 4 d 的雌蝇 30 头, 加入 30 mL ($0.04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.0) 磷酸缓冲液, 在电动匀浆器上匀浆 ($800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 8 个回合)。匀浆液用 2 层尼龙纱过滤, 将滤液在 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速下, 离心 20 min, 取上清液, 稀释 10 倍作为酶源。以上操作均在冰浴上进行。

1.5.2 测定方法 参照 A speren^[11] 方法并加以改进, 详细描述见文献 [12]。

1.6 NIA 对乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性的抑制作用

1.6.1 酶源制备 取羽化后 4~5 d 雌蝇若干头, 放入特制的铁笼中, 于 -20°C 低温冰柜中, 速冻 30 min, 取出用力摇动, 使头部与体躯分离, 然后取 25 个蝇头, 加入 5 mL ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 8.0) 磷酸缓冲液, 匀浆, 在 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 速度下, 离心 20 min, 取上清液作为酶源。

1.6.2 测定方法 参照 Ellman^[13] 方法, 但用 96 孔微量滴板测定, 详细描述见文献 [12]。

1.7 NIA 对多功能氧化酶 (MFO) 的抑制作用

1.7.1 酶源制备 取羽化后 5 d 雌蝇 600~800 头, 放入特制铁笼中, 于 -20°C 低温冰柜中冷冻 3 h。取出用力摇晃, 使腹部与体躯分离, 挑出 390 头雌蝇腹部, 用 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 清洗, 以便将腹部内含物排除出去, 然后加入 26 mL Tris-HCl 缓冲液 ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.8), 在玻璃电动匀浆器上匀浆 ($800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 8 个回合)。用尼龙纱过滤, 将滤液在 $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 速度下, 离心 20 min, 取上清液做为酶源, 以上操作均在冰浴上进行。

1.7.2 测定方法 参照袁家硅^[14] 方法, 略有改进, 详细描述见文献 [12]。

1.8 蛋白质含量测定

按 Bradford^[15] 方法进行。

2 结果与分析

2.1 增效实验

增效剂对溴氰菊酯的增效作用见表 1。

表 1 N IA、SV₁ 对溴氰菊酯的增效作用Table 1 Synergism of N IA and SV₁ to deltamethrin in susceptible and resistant houseflies

品系 Strains	增效剂 Synergist	使用浓度 (%) * Concentration (%)	溴氰菊酯 deltamethrin		
			LD ₅₀ 值/μg·头 ⁻¹	R/S	增效比 SR
SP	-	-	2.14 × 10 ⁻⁴	-	-
SP	N IA	1.00 × 10 ⁻⁴	1.13 × 10 ⁻⁴	-	1.81
	SV ₁	1.00 × 10 ⁻³	3.23 × 10 ⁻⁵	-	6.63
	-	-	21.46	100280.00	-
Del-R	N IA	1.00 × 10 ⁻³	0.10	467.29	214.60
	SV ₁	0.05	0.52	2429.90	41.27

注: * 所使用浓度, 均不引起家蝇死亡。

Note: * The concentration of synergists didn't lead to death of houseflies

由表 1 可知, 在敏感品系家蝇中, N IA 对溴氰菊酯的增效作用不明显, SR 值仅为 1.81; 而 SV₁ 增效比值为 6.63; 在 Del-R 家蝇品系中, N IA、SV₁ 对溴氰菊酯的增效比值分别为 214.60 和 41.27。由此证明: N IA 在 Del-R 品系家蝇中, 对溴氰菊酯的增效作用明显优于 SV₁。

2.2 N IA 对家蝇羧酸酯酶活性的抑制

在离体条件下, 家蝇羧酸酯酶活性及 N IA 对该酶的影响见表 2、图 1。

表 2 家蝇羧酸酯酶活性及 N IA 的抑制中浓度

Table 2 CarE activities and I₅₀ of N IA to CarE in Del-R houseflies

底物 Substrate	SP		Del-R	
	酶活/ nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹	酶活/ nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹	R/S	I ₅₀ /mol·L ⁻¹
α-NA	46.96(±2.20)	113.14(±3.26)	2.41	2.14(±0.22) × 10 ⁻⁷
β-NA	27.73(±1.91)	57.44(±0.37)	2.07	1.09(±0.39) × 10 ⁻⁹

由表 2 可知, 在 Del-R 品系家蝇中, 羧酸酯酶活性明显高于敏感品系, 分别为敏感系的 2.41 倍(α-NA) 和 2.07 倍(β-NA), 这是该品系对溴氰菊酯产生抗性的原因之一; 图 1 表明 N IA 对 Del-R 品系家蝇的羧酸酯酶有明显的抑制作用, 且底物不同, 酶对 N IA 的敏感程度也存在很大差异。当以 β-NA 做底物时, N IA 对酶活的抑制作用更为明显。

2.3 N IA 对家蝇 AChE 活性的抑制

在离体条件下, N IA 对 Del-R 品系家蝇头部 AChE 的抑制作用十分显著(见图 2), 其抑制中浓度为 2.37(±0.69) × 10⁻⁵ mol·L⁻¹。

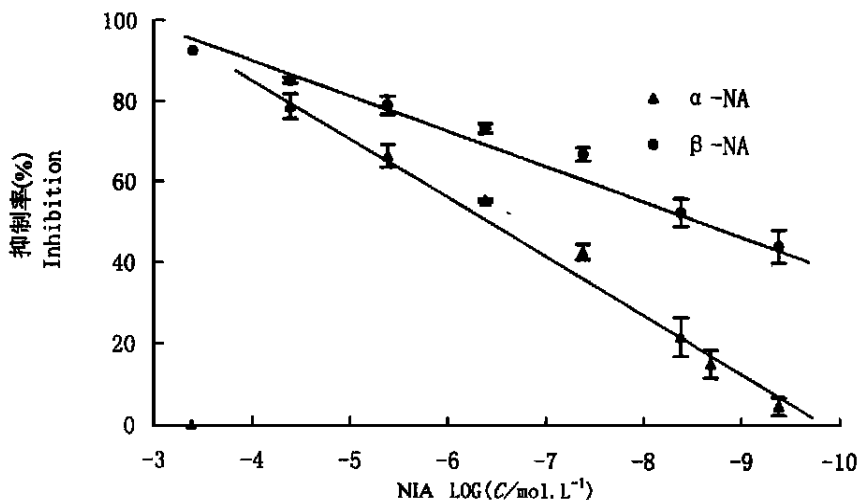


图1 NIA 对家蝇羧酸酯酶活性的抑制作用

Fig. 1 Effect of NIA on carboxylesterase activity

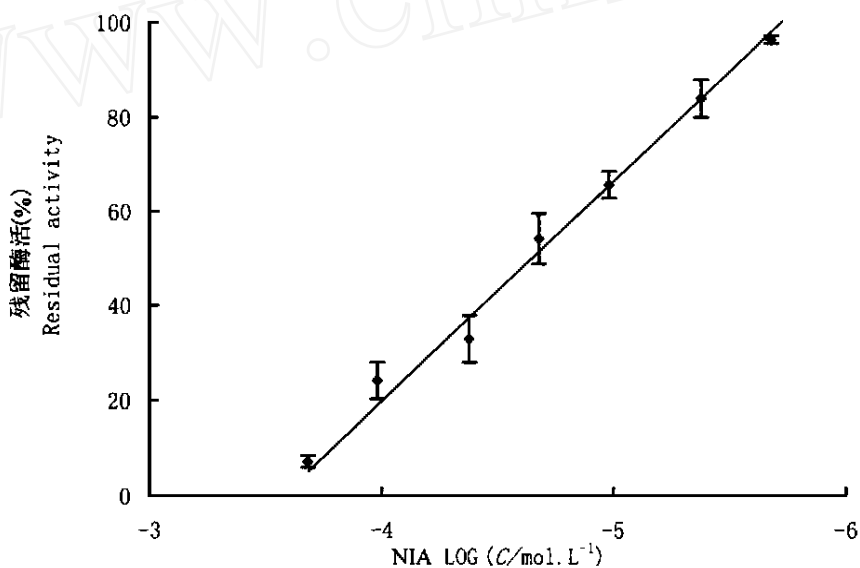


图2 NIA 对家蝇乙酰胆碱酯酶活性的影响(离体)

Fig. 2 Inhibition of NIA on AChE activity (*in vitro*)

2.4 NIA 对家蝇多功能氧化酶的抑制

通过 *o*-脱烷基反应, 测定了 NIA 对多功能氧化酶的影响, 结果见表 3。

表 3 多功能氧化酶(MFO)活性及N IA 的抑制作用
Table 3 MFO activities and inhibition of N IA on MFO

处 理 Treatment	SP	Del- R	抑制率(%) Inhibition(%)
	酶活/ nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹	酶活/ nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹ R/S	
对照CK	0.034(±0.001)	0.117(±0.025)	3.44
N IA			
4.20×10 ⁻⁶ mol·L ⁻¹		0.091(±0.017)	22.22(±1.95)
N IA			
4.20×10 ⁻⁴ mol·L ⁻¹		0.025(±0.005)	78.63(±0.13)

由表 3 可知在 Del- R 品系家蝇中, 多功能氧化酶活性为敏感品系的 3.44 倍, 这也是产生抗性的因素之一; 另外 Del- R 品系家蝇的多功能氧化酶对 N IA 也较为敏感, 当 N IA 浓度为 $4.20 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 其抑制率达到 78.63%。

3 讨 论

众所周知, 家蝇是一种世界性卫生害虫, 可传播多种病菌, 直接威胁着人类的健康及畜牧业的生产, 故对其进行控制已成为全球卫生领域的一项主题。由于家蝇对环境有高度的适应能力、繁殖力强、生活史短, 故用药频繁, 因而其对杀虫剂易产生抗性。到目前为止, 世界各地的家蝇对拟除虫菊酯的抗性已非常普遍, 如 1994 年匈牙利家蝇对生物苜蓿菊酯 SK-80、溴氰菊酯的抗性分别为 11904 倍、4317 倍和 1713 倍^[16]。1985 年, 我国家蝇对溴氰菊酯的抗性有的高达 2265 倍^[17]。为了寻找对抗性家蝇的治理方法, 我们用室内培育的 Del- R 品系家蝇为材料, 对 N IA 进行了增效试验, 结果表明, N IA 对溴氰菊酯的增效比高达 214.60, 较 SV₁ 的增效比值高 5.2 倍。另据 Pap^[7]、Nicholson^[8] 报道, 在拟除虫菊酯抗性品系家蝇中, N IA 对拟除虫菊酯的增效作用明显高于 PBO。由此可见, 在拟除虫菊酯抗性家蝇治理中, N IA 具有广阔的应用前景。

对抗性昆虫而言, 同一种昆虫对不同类型的杀虫剂, 不同昆虫对同一种杀虫剂产生抗性的机理各异, 同一种昆虫, 不同的发育阶段, 不同的抗性水平, 其抗性机制也各不相同, 故在用 N IA 做增效实验时, 可导致人们在推测其增效机理时产生差异。例如: N IA 对由于羧酸酯酶活性提高而引起抗性的昆虫增效时, 人们可能认为, N IA 是羧酸酯酶的抑制剂^[5, 18]。依此类推, 有人则认为, N IA 是多功能氧化酶的抑制剂, 或两者兼而有之^[7, 8]。我们通过实验证明: N IA 对溴氰菊酯的增效作用是多靶标位点综合作用的结果, N IA 可抑制体内解毒酶系的活性, 其对羧酸酯酶的抑制程度明显高于对多功能氧化酶的抑制, 即便对羧酸酯酶而言, 当底物不同时, 其抑制作用也存在明显的差异, 其中以 β -NA 羧酸酯酶对 N IA 更为敏感。另外 N IA 还可作用于神经靶标部位的乙酰胆碱酯酶(AChE)。几方面的综合作用, 使得 N IA 在 Del- R 品系家蝇中, 对溴氰菊酯表现出极强的增效作用。另据侯能俊^[19]报道, N IA 还可通过加强杀虫剂在虫体表面的穿透能力而起到增效作用。由此我们认为, N IA 是一个多功能的增效剂。

参 考 文 献

- 1 姜志宽, 郑剑, 钱万红等 卫生杀虫药械, 1995, 1(1): 37~ 39
- 2 李国清, 王荫长 华东昆虫学报, 1997, 6(2): 90~ 95
- 3 王荫长, 李显春 卫生杀虫药械, 1997, 3(1): 39~ 40
- 4 李国清, 李显春, 王荫长等 南京农业大学学报, 1996, 19(增刊): 132~ 137
- 5 Nishimura K., Okajima N., Fujita T. *et al.* *Pestic Biochem. Physiol.*, 1982, 18: 341~ 350
- 6 Nishimura K. *Pestic Sci.*, 1992, 34: 249~ 255
- 7 Pap L., Toth A. *Pestic Sci.*, 1995, 45: 335~ 349
- 8 Nicholson R. A., Sawicki R. M. *Pestic Sci.*, 1982, 13: 357~ 366
- 9 Miyamoto J., Suzuki T. *Pestic Biochem. Physiol.*, 1973, 3: 30~ 41
- 10 Russell N. E., Robertson J. L., Russell R. M. *Bull. Entomol. Soc. Am.*, 1977, 23: 257
- 11 Asperen K. *J. Ins. Physiol.*, 1962, 8: 401~ 416
- 12 何运转, 李梅, 冯国蕾等 南京农业大学学报, 1999, 22(2): 32~ 36
- 13 Elman G. L., Courtney K. D., Andres V. *et al.* *Biochem. Pharmacol.*, 1961, 7: 88~ 95
- 14 袁家硅, 孙耘芹, 冯国蕾 害虫抗药性及其防治论文汇编, 陕西杨陵: 天则出版社, 1992: 20~ 24
- 15 Bradford M. M. *Anal. Biochem.*, 1976, 72: 248~ 254
- 16 Pap L. *Pestic Sci.*, 1994, 40: 245~ 258
- 17 唐振华. 昆虫抗药性及其治理, 北京: 农业出版社, 1993: 43
- 18 陈巧云, 侯能俊, 邓启荣等 核农学报, 1991, 5(3): 173~ 177
- 19 侯能俊, 邓启荣, 林国芳等 核农学报, 1990, 4(4): 243~ 246

Synergistic Mechanism of NIA 16388 to Deltamethrin in Deltamethrin-Resistant Housefly (*Musca domestica*)

He Yunzhan¹ Li Mei² He Fengqin² Feng Guolei² Wang Yinchang³

¹ Department of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001;

² Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing 100080; ³ Department of Plant Protection,
Agricultural University of Nanjing, Nanjing 210095)

Abstract Synergism of NIA 16388 (NIA) to deltamethrin in housefly of Del-R strain was studied. Result of bioassay showed that synergistic rate of NIA to deltamethrin was 214.60. The synergistic mechanism of NIA was also researched. The results suggested that: (1) NIA inhibited Carboxylesterase (CarE) activities significantly and I_{50} value to CarE were $2.14 (\pm 0.22) \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (α -NA) and $1.09 (\pm 0.39) \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (β -NA), respectively; (2) The inhibition of MFO activity by NIA was 78.63 (± 0.13)% when NIA concentration was $4.20 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; (3) NIA could inhibit AChE activity and I_{50} value was $2.37 (\pm 0.69) \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Accordingly NIA is considered a multi-target synergistic agent.

Key words NIA 16388; Synergistic mechanism; Deltamethrin