

新烟碱杀虫剂环氧虫啉对苜蓿蚜的毒力及其在苜蓿蚜和水稻中的降解转化

吴嘉瑶¹ 梅倩倩¹ 吴勇超¹ 程家高^{1*} 李忠^{1,2} 须志平^{1*}

(1. 华东理工大学药学院, 上海市化学生物学(芳香杂环)重点实验室, 上海 200237;

2. 上海生物制造技术协同创新中心, 上海 200237)

摘要:为明确顺硝烯新烟碱杀虫剂环氧虫啉对苜蓿蚜 *Aphis craccivora* Koch 的毒力及其在苜蓿蚜体内和水稻中的降解转化趋势, 采用带虫浸液法测定环氧虫啉及其降解产物 NTN32692 对苜蓿蚜的毒力, 并采用超高效液相色谱检测法研究苜蓿蚜体内不同酶对环氧虫啉降解转化的影响以及环氧虫啉在水稻中降解转化为 NTN32692 的情况。结果表明: 环氧虫啉及其降解产物 NTN32692 对苜蓿蚜的 LC_{50} 分别为 3.45 mg/L 和 0.79 mg/L, NTN32692 的毒力明显高于环氧虫啉。与对照组相比, 在添加酶抑制剂的条件下, 苜蓿蚜谷胱甘肽 *S*-转移酶孵育液中环氧虫啉和 NTN32692 的浓度均显著降低, 羧酸酯酶和细胞色素 P450 酶孵育液中环氧虫啉和 NTN32692 的浓度变化不显著。用不同浓度环氧虫啉处理水稻 24 h 后, 叶片中环氧虫啉和 NTN32692 的累积量随着浓度提高均显著增加; 在水稻中的残留动态表明, 培养 7 d 后, 叶片中环氧虫啉和 NTN32692 的浓度皆显著降低, 降幅分别达到 67.33% 和 89.42%。

关键词: 环氧虫啉; NTN32692; 苜蓿蚜; 水稻; 降解转化

Toxicity of the new neonicotinoid insecticide cycloxaprid on groundnut aphid *Aphis craccivora* and its degradation and transformation in *A. craccivora* and rice plants

Wu Jiayao¹ Mei Qianqian¹ Wu Yongchao¹ Cheng Jiagao^{1*} Li Zhong^{1,2} Xu Zhiping^{1*}

(1. Shanghai Key Laboratory of Chemical Biology, School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. Shanghai Collaborative Innovation Center for Bioprocessing Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: To figure out the insecticidal activity of cycloxaprid against groundnut aphid *Aphis craccivora* Koch, the leaf-dip method was performed to test the acute toxicity of cycloxaprid and NTN32692 on *A. craccivora*, and ultraperformance liquid chromatography (UPLC) method was adopted to study the hydrolysis of cycloxaprid into NTN32692 in *A. craccivora* and rice plants. The LC_{50} value of cycloxaprid against *A. craccivora* was 3.45 mg/L, which was lower than that of NTN32692 (0.79 mg/L). With glutathione *S*-transferase inhibitor treatment, the concentration of cycloxaprid and NTN32692 in *A. craccivora* enzymatic incubation solution was obviously less than that in the control. However, the concentrations of cycloxaprid and NTN32692 were not significantly different in *A. craccivora* enzymatic incubation solution with carboxylesterase inhibitor and with/without NADPH in cytochrome P450 monooxygenase. The accumulation of cycloxaprid and NTN32692 increased significantly in rice leaves with different cycloxaprid dosage treatments in 24 h. Cycloxaprid and NTN32692 were both found to be de-

graded in rice plants within seven days. The contents of cycloxyaprid and NTN32692 in rice plants were decreased significantly, up to 67.33% and 89.42%, respectively.

Key words: cycloxyaprid; NTN32692; *Aphis craccivora* Koch; rice; degradation and transformation

在农业领域,害虫的发生与为害严重影响着农作物产量,是全球粮食危机的主要原因之一。杀虫剂的应用有效减少了粮食损失(张一宾和钱虹,2015;徐红星等,2017)。目前,新烟碱类杀虫剂作为最大的杀虫剂类型之一(Simon-Delso et al.,2015),约占全球杀虫剂市场销售份额的25%(Bass et al.,2015),因其具有高效广谱、对哺乳动物低毒、环境相容性高等特点,被广泛用于防治褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål) 和烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius) 等刺吸式口器害虫及部分鞘翅目和鳞翅目害虫(Tomizawa & Casida,2003)。然而,由于长期频繁施用,新烟碱类杀虫剂面临着严重的抗性及其交互抗性,从而限制了其应用发展(Prabhaker et al.,2005; Bass et al.,2014)。

环氧虫啉是具有自主知识产权的新型新烟碱类杀虫剂,由于其对吡虫啉抗性害虫具有较高的杀虫活性而表现出良好的市场前景(Shao et al.,2009;2013a)。环氧虫啉与新烟碱类其它杀虫剂类似,不仅可以通过触杀方式防治害虫,也具有较好的内吸性(Cui et al.,2012),可有效防治稻飞虱、蚜虫、烟粉虱等刺吸式口器害虫及部分鳞翅目害虫。环氧虫啉具有独特的氧桥环顺硝烯结构,在酸性条件下较易发生水解,生成产物1-(6-氯吡啶-3-基甲基)-2-(硝基亚甲基)咪唑啉(1-(6-chloropyridine)-2-nitromethylene-imidazolidines),简称NTN32692,该化合物具有很高的杀虫活性,但较易发生光降解(Li et al.,2011;Shao et al.,2013b;庄英滢,2014)。根据已有研究结果推测,在田间害虫防治中环氧虫啉与NTN32692可能共同发挥作用(Shao et al.,2013c)。基于前期环氧虫啉对苜蓿蚜 *Aphis craccivora* Koch 体内解毒酶活性影响的研究,发现谷胱甘肽S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)和细胞色素P450酶在环氧虫啉的解毒代谢过程中发挥着主要作用(吴勇超等,2016),但苜蓿蚜体内相关代谢酶对环氧虫啉降解转化为NTN32692的影响以及环氧虫啉被作物吸收后降解转化为NTN32692的情况均未见研究报道。

目前,环氧虫啉已获得国家新农药临时登记许可,为促进其在农业生产中的高效合理应用,本试验拟研究环氧虫啉及其降解产物NTN32692在苜蓿蚜和水稻植株中的降解转化情况。首先通过生物测定比较环氧虫啉及NTN32692对苜蓿蚜的毒力及致死

时间的差异;并分析苜蓿蚜体内相关酶对环氧虫啉降解代谢为NTN32692的影响;此外,由于环氧虫啉主要登记作物为水稻,因此以水稻为作物模型进一步研究环氧虫啉和NTN32692在水稻体内的降解转化情况;通过比较环氧虫啉和NTN32692在水稻体内的降解程度差异性,探究环氧虫啉在生物体内的转化情况,以期对环氧虫啉在实际生产中的应用研究和后期的开发利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源及植物:苜蓿蚜为国家南方农药创制中心上海基地饲养的室内敏感品系。在温度25℃、光周期16 L:8 D、相对湿度70%~80%条件下用蚕豆苗饲养。取羽化后的1日龄成虫供试。蚕豆品种为启豆1号,于温度25℃、光周期12 L:12 D、相对湿度80%条件下培养,待芽长至3~5 cm时用于试验;水稻品种为武运粳7号,于温度22℃、光周期12 L:12 D、相对湿度70%条件下培养,生长至3~4叶时进行试验。所用水稻营养液参照国际水稻所常规营养液配方配制(毛达如,1994)。2种植物均由国家南方农药创制中心上海基地提供。

药剂及试剂:97%环氧虫啉(cycloxyaprid)原药,上海生农生化制品股份有限公司;化合物NTN32692(纯度96%)由本课题组提供。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)、顺丁烯二酸二乙酯(diethyl maleate, DEM),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;磷酸三苯酯(triphenyl phosphate, TPP)、乙腈(分析纯),上海泰坦科技股份有限公司;Bradford试剂盒,普利莱基因技术有限公司;乙腈(Merck 色谱纯)、0.22 μm 亲水性滤膜、0.7 μm 玻璃纤维滤膜,上海安普科学仪器有限公司;其余试剂均为国产分析纯。

仪器:Acquity 超高效液相色谱H-Class系统,沃特世科技有限公司;2-16PK 高速离心机,美国Sigma-Aldrich公司;CP80MX 超速离心机,日本株式会社日立制作所;SB-1000 旋转蒸发器,东京理化机械株式会社。

1.2 方法

1.2.1 环氧虫啉和NTN32692对苜蓿蚜毒力的测定
已有研究表明,环氧虫啉的水解途径仅有一条,

即水解生成NTN32692(Shao et al., 2013b)。因此,以苜蓿蚜为生测对象,采用带虫浸液法(张靖等, 2015)分别测定环氧虫啉及其水解产物NTN32692对刺吸式口器害虫的毒力效果。首先将供试药剂分别溶于二甲基亚砜,配置成 1×10^4 mg/L的母液。然后用含0.05% TritonX-100的清水将环氧虫啉的浓度等比稀释至10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125 mg/L,将NTN32692的浓度等比稀释至5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625 mg/L。将带有20~30头无翅苜蓿蚜成虫的蚕豆苗分别在各浓度药液中浸泡10 s,取出并吸干多余药液。然后将带虫蚕豆苗插入用清水浸润的海绵中,于25℃下恒温培养,48 h后统计苜蓿蚜死亡情况并计算死亡率和致死中浓度(lethal concentration 50, LC_{50})。每处理重复3次,以含0.05% TritonX-100和1%二甲基亚砜的清水为对照(吴勇超等, 2016)。毒力倍数=环氧虫啉的 LC_{50} /NTN32692的 LC_{50} 。

为研究环氧虫啉及其水解产物NTN32692对苜蓿蚜致死速率的差异,采用带虫浸液法测定不同施药时间内,环氧虫啉和NTN32692对苜蓿蚜的致死情况。以环氧虫啉和NTN32692的 LC_{50} 处理苜蓿蚜,方法同上,分别在处理后2、4、7、10、16、22、34 h统计苜蓿蚜死亡情况。每处理重复3次,以含0.05% TritonX-100和1%二甲基亚砜的清水为对照。

1.2.2 环氧虫啉和NTN32692标准曲线的绘制

精确称量环氧虫啉和NTN32692标准品,将2种化合物分别溶于乙腈(色谱纯)中,超声至完全溶解,配制成200 mg/L的母液,用乙腈将环氧虫啉稀释成100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.5625 mg/L的溶液,将NTN32692稀释成25、12.5、6.25、3.125、1.563、0.781、0.391 mg/L的溶液。将配制好的2种化合物标准溶液分别按照浓度由低到高的顺序进行超高效液相色谱(ultraperformance liquid chromatography, UPLC)检测分析,并绘制标准曲线。UPLC检测条件:色谱柱为HSS T3(1.8 μ m, 100 mm $\times$ 2.1 mm),柱温为40℃,流速为0.4 mL/min,使用PDA检测器,环氧虫啉和NTN32692的检测波长分别为340 nm和325 nm。采用自动进样器,10 μ L定量环,每次进样1 μ L。流动相采用超纯水和乙腈体系,梯度洗脱比例:0 min时超纯水:乙腈=90:10,5 min时超纯水:乙腈=82:18,6 min时超纯水:乙腈=82:18,10 min时超纯水:乙腈=75:25,11 min时超纯水:乙腈=90:10。

1.2.3 环氧虫啉在苜蓿蚜酶液中降解转化的测定

取苜蓿蚜成虫50头放入2 mL离心管中,加入

pH 7.4的0.1 mol/L磷酸缓冲液1.5 mL,冰浴研磨后,于4℃下以10 000 g离心20 min,取上清液作为酶液,依据试验中酶液实际使用量进行多批次提取。

采用Bradford(1976)的方法测定苜蓿蚜酶液中蛋白含量,加入磷酸缓冲液使酶液中蛋白终浓度为1 000 mg/mL。将酶液加入到40 μ L环氧虫啉溶液(溶于二甲基亚砜,浓度为 1×10^4 mg/L)中,使体系中环氧虫啉终浓度为100 mg/L,体系总体积为4 mL,将酶液替换为磷酸缓冲液作为对照组。每处理重复3次。各试验组置于30℃下避光恒温水浴孵育,于不同时间点2、4、6、8 h分别取样0.5 mL,加1 mL冰乙腈终止反应,于1 000 g下离心10 min,取上清液过0.22 μ m亲水性滤膜后,利用UPLC检测环氧虫啉及其水解产物NTN32692的浓度,每处理浓度重复检测3次,检测条件同1.2.2。

1.2.4 苜蓿蚜代谢酶对环氧虫啉降解转化的影响测定

为了解靶标昆虫体内相关酶对环氧虫啉降解转化的影响,利用CarE抑制剂TPP和GST抑制剂DEM,以及添加辅助因子NADPH为条件,通过UPLC检测方法进行环氧虫啉和NTN32692浓度的测定,分别以环氧虫啉浓度减少量和NTN32692浓度增加量表示苜蓿蚜体内3种不同代谢酶羧酸酯酶(carboxylesterase, CarE)、GST和细胞色素P450酶对环氧虫啉降解转化的影响。

CarE和GST对环氧虫啉降解转化的影响测定:参照1.2.3方法提取苜蓿蚜酶液,使酶液中蛋白终浓度为1 000 mg/L,并向酶液中加入 1×10^4 mg/L环氧虫啉溶液20 μ L、 1×10^4 mg/L CarE抑制剂TPP 20 μ L或 1×10^4 mg/L GST抑制剂DEM 20 μ L,使反应体系总体积为2 mL。对照组添加等体积的苜蓿蚜酶液,并将酶抑制剂替换成等体积的磷酸缓冲液。同1.2.3反应条件,避光孵育4 h后利用UPLC检测环氧虫啉和NTN32692的浓度,方法同1.2.2。

细胞色素P450酶对环氧虫啉降解转化的影响测定:取50头苜蓿蚜成虫,加入研磨缓冲液(含pH 7.4的0.1 mol/L磷酸缓冲液、1 mmol/L乙二醇四乙酸、0.1 mmol/L二硫苏糖醇、1 mmol/L苯基硫脲及1 mmol/L苯甲基磺酰氟),研磨后于4℃下以10 000 g离心30 min,取上清液再于相同条件下离心60 min,取沉淀,用含体积分数20%的甘油研磨缓冲液重悬浮,作为细胞色素P450酶液。测定蛋白浓度后加入适量上述研磨缓冲液,使细胞色素P450酶终浓度为75 μ g/mL。向环氧虫啉溶液中加入1 000 μ L细胞色素P450酶液和150 μ L初始浓度为20 mmol/L的辅助

因子NADPH水溶液,使反应体系中环氧虫啉浓度为100 $\mu\text{g/mL}$,添加研磨缓冲液使反应总体积为1.5 mL,作为试验组(+NADPH)。将NADPH替换为等体积研磨缓冲液作为空白组(-NADPH),将辅助因子NADPH和细胞色素P450酶液均替换为等体积研磨缓冲液作为对照组,每处理重复3次。反应条件同1.2.3,避光孵育4 h后利用UPLC检测环氧虫啉和NTN32692的浓度,方法同1.2.2。

1.2.5 不同施药浓度对药剂在水稻中积累量的影响测定

将环氧虫啉溶于二甲基亚砜中,配成 1×10^4 mg/L母液,然后用清水分别稀释至50、100、200 mg/L,待用。挑选15~20 cm健壮且根部无损伤的水稻苗,插入外包锡箔纸的培养管中,每组15棵,分别加入不同浓度的环氧虫啉溶液,适宜条件下浸根培养。将环氧虫啉溶液替换为含1%二甲基亚砜的清水作为对照组。各组重复5~7次。培养24 h后选取处理组和对照组水稻叶片洗净,各组精确称量2 g,剪碎后加入30 mL乙腈超声提取60 min,取上清液过0.7 μm 玻璃滤膜。加入0.2 g氯化钠和0.8 g无水硫酸镁,涡旋1 min,除水,旋蒸浓缩,以10 000 g离心10 min,除去不溶杂质,用乙腈定容至5 mL,过0.22 μm 亲水性滤膜得到样品,常温避光下保存。利用UPLC检

测各处理组样品中环氧虫啉和NTN32692的浓度,方法同1.2.2。

1.2.6 环氧虫啉与NTN32692在水稻中残留动态检测

100 mg/L环氧虫啉溶液浸根培养水稻苗24 h后,用清水冲洗植株,吸干叶片表面水分后,将水稻苗转移至新的培养管,加入新鲜水稻营养液避光培养(营养液中不添加环氧虫啉)。培养1、3、7 d时取样检测水稻叶片中环氧虫啉和NTN32692的浓度,方法同1.2.5。添加100 mg/L环氧虫啉培养水稻苗24 h时,以水稻叶片中环氧虫啉和NTN32692的浓度作为检测的初始浓度。

1.3 数据分析

采用POLO-plus软件对毒力测试数据进行处理,计算 LC_{50} 等相关数据;通过DPS 3.0软件对试验数据进行统计分析,应用最小显著差数(LSD)法和Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 环氧虫啉和NTN32692对苜蓿蚜的毒力

环氧虫啉及其水解产物NTN32692对苜蓿蚜的 LC_{50} 分别为3.45 mg/L和0.79 mg/L,后者的毒力明显高于环氧虫啉,毒力倍数为环氧虫啉的4.37倍。

表1 环氧虫啉和NTN32692对苜蓿蚜的毒力

Table 1 Toxicities of cycloxyaprid and NTN32692 to *Aphis craccivora* Koch

处理 Treatment	LC_{50} (95% CL) (mg/L)	斜率 Slope $\pm$ SD	毒力倍数 Toxicity ratio
环氧虫啉 Cycloxyaprid	3.45(2.77-4.51)	1.48 $\pm$ 0.13	1.00
NTN32692	0.79(0.56-1.05)	2.50 $\pm$ 0.19	4.37

分别用 LC_{50} 浓度的环氧虫啉和NTN32692处理苜蓿蚜后,检测不同施药时间内环氧虫啉及NTN32692对苜蓿蚜的致死速率,发现在施药后20 h内环氧虫啉对苜蓿蚜的致死速率慢于NTN32692(图1)。在0~10 h内环氧虫啉处理苜蓿蚜的死亡率均在2.00%以下,20 h后死亡率逐步提升至41.27%,随后趋于平缓。水解产物NTN32692处理苜蓿蚜7 h后,苜蓿蚜的死亡率已超过37.20%,10 h后苜蓿蚜死亡率达到40.46%,随后趋于平缓。表明在药剂处理20 h内,NTN32692对苜蓿蚜的毒力和速效性都高于环氧虫啉。

2.2 环氧虫啉和NTN32692的标准曲线

根据环氧虫啉和NTN32692在UPLC检测中的吸收峰面积,制作2种化合物的标准曲线。环氧虫啉的检测波长为340 nm,保留时间为5.6 min,标准曲线为 $y=6\,357.00x+763.65$, y 为吸收峰面积, x 为环氧虫啉浓度,相关系数 R^2 为0.99;NTN32692的检测

波长为325 nm,保留时间为4.2 min,标准曲线为 $y=12\,949.88x-343.85$, y 为吸收峰面积, x 为NTN32692的浓度,相关系数 R^2 为0.99。

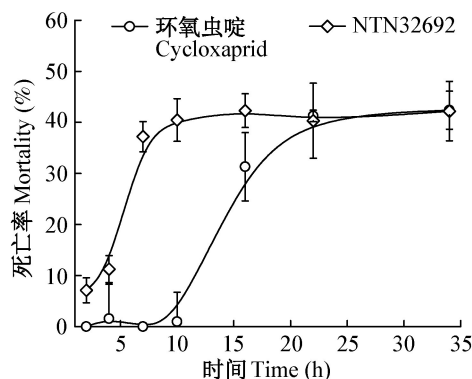


图1 环氧虫啉和NTN32692对苜蓿蚜的致死率动态变化

Fig. 1 The lethal rate of cycloxyaprid and NTN32692 to *Aphis craccivora* with time

图中数据均为平均数 $\pm$ 标准误。Data are mean $\pm$ SE.

2.3 环氧虫啉在苜蓿蚜酶液中的降解转化

加入酶液孵育后,处理组环氧虫啉浓度较对照组显著降低,且具有时间依赖性(图2-A)。加入酶液孵育2 h后,环氧虫啉浓度显著低于对照组,孵育

4、6、8 h后二者间差异极显著($P<0.01$);同样,随着孵育时间延长,处理组中NTN32692浓度显著升高(图2-B),与对照组差异显著($P<0.05$)。表明苜蓿蚜酶液对环氧虫啉的降解转化具有一定促进作用。

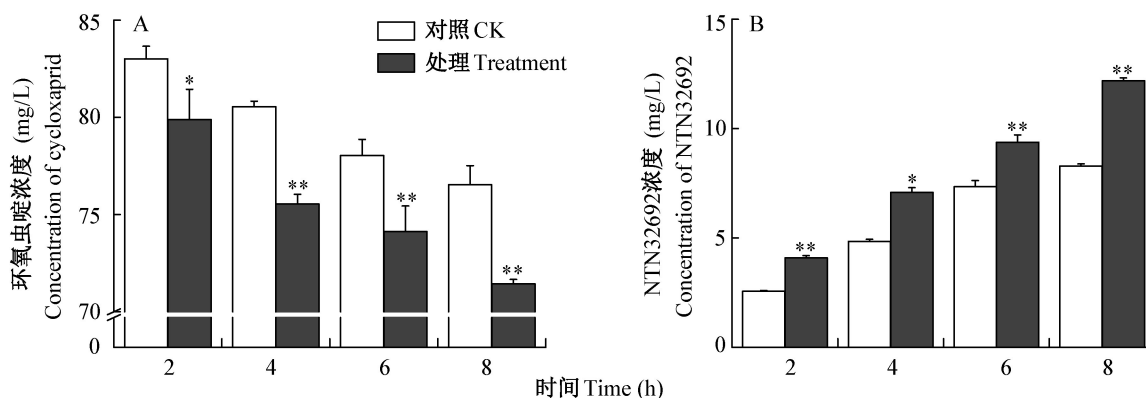


图2 苜蓿蚜酶液对环氧虫啉降解和NTN32692转化生成的影响

Fig. 2 Effects of the enzyme solution of *Aphis craccivora* on the degradation of cycloxyprid and transformation of NTN32692

图中数据为平均数±标准误。*和**分别表示处理和对照之间经LSD法检验在 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平差异显著。Data are mean±SE. * or ** indicates significant difference between treatment and CK at $P<0.05$ or $P<0.01$ level by LSD test, respectively.

2.4 苜蓿蚜不同代谢酶对环氧虫啉降解转化的影响

不添加任何酶抑制剂时(对照组),环氧虫啉的浓度降低了10.70 mg/L,而NTN32692(由环氧虫啉降解转化生成)的浓度升高了5.24 mg/L;加入GST抑制剂DEM后,环氧虫啉减少量(7.50 mg/L)和NTN32692增加量(3.60 mg/L)与对照组相比均显著减少($P<0.05$);而加入CarE抑制剂TPP后,环氧虫啉减少量及NTN32692增加量均变化不大,且差异不显著(图3-A)。由此推测,当GST活性受到一定

抑制时,苜蓿蚜对环氧虫啉的降解能力有所下降,初步表明GST对环氧虫啉降解转化具有一定的促进作用。

加入NADPH进行孵育后,环氧虫啉减少量与对照组、空白组(-NADPH)相比,差异不显著。且不同处理组中NTN32692浓度的变化与对照组和空白组均无显著差异(图3-B)。推测在目前的检测条件下,细胞色素P450酶并未对环氧虫啉的降解和NTN32692的转化生成产生影响。

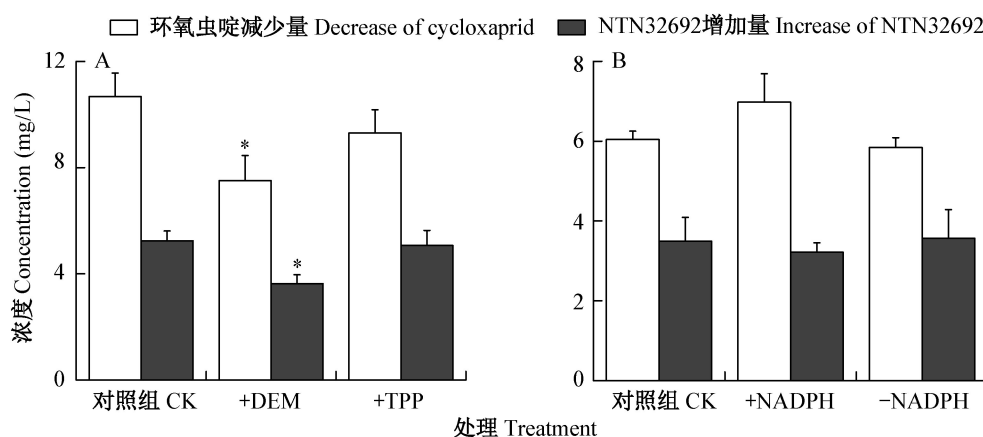


图3 不同代谢酶对水稻苗中环氧虫啉降解和NTN32692生成的影响

Fig. 3 Effects of different metabolic enzymes on the degradation of cycloxyprid and transformation of NTN32692 in rice plants

+DEM: 添加谷胱甘肽S-转移酶抑制剂DEM; +TPP: 添加羧酸酯酶抑制剂TPP; +/-NADPH: 添加/不添加细胞色素P450酶辅助因子NADPH。图中数据为平均数±标准误。*表示处理和对照之间经LSD法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。+DEM: With glutathione S-transferase inhibitor DEM added; +TPP: with carboxylesterase inhibitor TPP added; +/-NADPH: with/without cyp450 auxiliary factor NADPH added. Data are mean±SE. * indicates significant difference at $P<0.05$ level between treatment and CK by LSD test.

2.5 施药浓度对环氧虫啉在水稻叶中积累转化的影响

在处理24 h后,随着环氧虫啉浓度增加,水稻叶中环氧虫啉及NTN32692的积累量逐渐增加(图4)。当浓度由50 mg/L增加到100 mg/L时,水稻叶中环氧虫啉的浓度迅速提升,从6.04 $\mu\text{g/g}$ FW提升到15.72 $\mu\text{g/g}$ FW,且差异显著($P<0.05$);当浓度继续增加到200 mg/L时,水稻叶中的环氧虫啉浓度继续提升,但与100 mg/L试验组差异不显著。

当环氧虫啉的浓度由50 mg/L增加到100 mg/L时,NTN32692在水稻叶中的积累量由10.07 $\mu\text{g/g}$ FW提升至18.32 $\mu\text{g/g}$ FW,2个处理组间差异极显著($P<0.01$)。当环氧虫啉浓度为200 mg/L时,NTN32692积累量极显著升高,达到46.84 $\mu\text{g/g}$ FW。

随着环氧虫啉施用浓度的提升,2种药剂在水稻叶中的积累量均明显增加。环氧虫啉积累呈现出由快渐缓的趋势,而NTN32692的积累始终表现为极显著提升;且在相同处理条件下,NTN32692的积累量始终高于环氧虫啉。推测当环氧虫啉浓度高于100 mg/L时,水稻可有效吸收环氧虫啉并转化生成NTN32692。

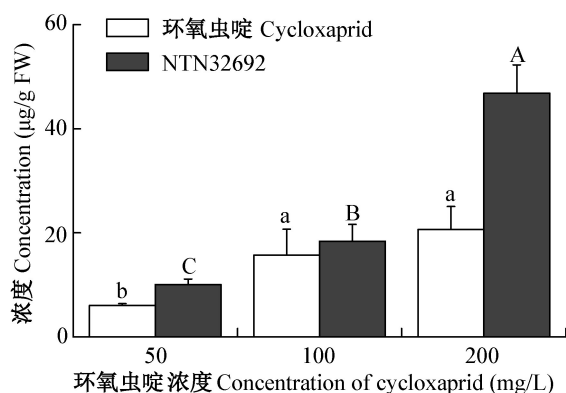


图4 不同施药浓度处理24 h后环氧虫啉和NTN32692在水稻叶中的积累情况

Fig. 4 The concentrations of cycloxyprid and NTN32692 at 24 h in rice leaf tissues with different cycloxyprid dosage treatments

图中数据为平均数 $\pm$ 标准误。不同小写字母和不同大写字母分别表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平差异显著。Data are mean $\pm$ SE. Different lowercase letters or uppercase letters indicate significant difference at $P<0.05$ or $P<0.01$ level by Duncan's new multiple range test.

2.6 环氧虫啉与NTN32692在水稻中的残留动态

通过浸根培养,发现环氧虫啉浓度高于100 mg/L时,水稻可有效吸收环氧虫啉并累积转化生成NTN32692(图4)。因此进一步探究2种药剂在水稻中的持续降解转化情况,有助于了解田间用药后植株

体内残留药剂对靶标害虫防治持效期的影响。在浸根培养水稻苗24 h后,随着无药培养时间的增加,水稻叶中环氧虫啉和NTN32692的浓度均呈现下降趋势(图5)。其中,环氧虫啉下降速度较为缓慢,在培养3 d后下降了29.55%。培养7 d后,水稻叶中环氧虫啉的浓度显著降低($P<0.05$),由15.97 $\mu\text{g/g}$ FW降低至5.22 $\mu\text{g/g}$ FW,下降幅度为67.33%。相较于环氧虫啉,NTN32692在水稻叶中的浓度降低较快,培养3 d时,在水稻叶中的浓度下降了64.18%;培养至7 d时,在水稻叶中的浓度显著下降了89.42%($P<0.05$)。

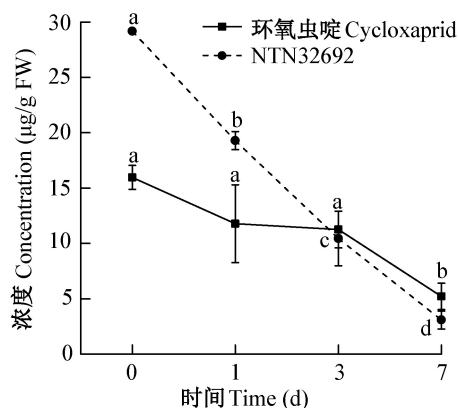


图5 水稻叶中环氧虫啉和NTN32692浓度随时间的变化

Fig. 5 The concentrations of cycloxyprid and NTN32692 in rice leaf tissues with time

图中数据为平均数 $\pm$ 标准误。同一条线上不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean $\pm$ SE. Different letters above the same line indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

3 讨论

环氧虫啉具有广谱和高效的杀虫活性,特别对抗吡虫啉的褐飞虱和烟粉虱具有高活性,是极有市场前景的新烟碱杀虫剂(Shao et al., 2009)。针对环氧虫啉的活性谱和作用方式的研究表明,它对刺吸式害虫如褐飞虱、烟粉虱、棉蚜 *Aphis gossypii* (Glover)、葡萄斑叶蝉 *Erythroneura apicalis* (Nawa) 等具有良好的防治效果,对禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi* (L.) 具有很好的触杀和根部内吸活性(Cui et al., 2010),这说明环氧虫啉可以通过触杀或植物内吸作用很好地防治靶标害虫。

相比于传统新烟碱杀虫剂,环氧虫啉在碱性条件下稳定,酸性条件下易水解为活性化合物NTN32692;与靶标受体的结合试验表明,NTN32692与nAChR的结合能力是环氧虫啉的15~40倍(Shao et al., 2013b)。因此,本研究分别测定环氧虫啉及其水解

产物 NTN32692 对苜蓿蚜的毒力和致死速率,发现 NTN32692 的毒力明显高于环氧虫啉,毒力倍数为环氧虫啉的 4.37 倍;在相同处理时间内,与环氧虫啉相比,NTN32692 作用于苜蓿蚜的时间更快,毒力更高。通常,若杀虫剂的降解产物也具有一定的杀虫活性,则将有助于增加杀虫剂对害虫的毒力(Li et al., 2011)。因此,在田间施药环境条件下,通过剂型加工等方法,充分利用环氧虫啉较好的光稳定性和 NTN32692 的高杀虫活性可以在害虫防治中发挥更好的杀虫效果。

前期研究发现,经过环氧虫啉处理后,苜蓿蚜体内 CarE 活性无明显变化,而 GST 和细胞色素 P450 酶活性均有升高,推测在对环氧虫啉的代谢中,GST 和细胞色素 P450 酶发挥一定作用(吴勇超等, 2016)。本试验研究结果也表明苜蓿蚜酶液对环氧虫啉的降解转化具有一定的促进作用。基于此,本试验通过添加酶抑制剂的方法,研究 CarE 和 GST 对环氧虫啉降解转化的影响,发现 CarE 对环氧虫啉的降解及 NTN32692 的生成没有影响;而当 GST 的活性受到抑制时,环氧虫啉的降解和 NTN32692 的生成明显受到抑制,表明 GST 对环氧虫啉降解转化具有一定的促进作用;此外,对细胞色素 P450 酶的研究结果显示,在共同孵育 4 h 后,P450 酶并未影响环氧虫啉的降解和 NTN32692 的转化生成。由于受限于化学分析仪器的检测条件,本研究中主要通过提取苜蓿蚜离体酶液与环氧虫啉共同孵育进行降解转化的测定,而昆虫体内相关代谢系统更为复杂,因此环氧虫啉和 NTN32692 在昆虫活体体内的降解转化情况还有待进一步研究,特别是通过检测灵敏度更高的仪器或采用其它最新的定量检测方法。

大多数新烟碱类杀虫剂通过内吸作用进入植物体内,有助于缓解因光解而产生活性降低的影响(Ford & Casida, 2008),且杀虫剂通过内吸作用进入植物体内,对于防治刺吸式口器害虫有良好的效果(Li et al., 2011; 高志山等, 2016)。稳定性研究结果表明,25% 环氧虫啉可湿性粉剂在水中显示了比原药更好的稳定性,进一步确定其水解途径仅有一条,即生成 NTN32692(庄英滢, 2014)。此外,Zhang et al. (2013) 研究发现 ^{14}C -环氧虫啉被吸附到小白菜根部后可以通过木质部运输系统和自由扩散作用从根部转移到植株其它部位;Liu et al. (2015a, b; 2016) 研究结果表明环氧虫啉在土壤中的持效期为 5 d, 28 d 时其在土壤中的含量下降到最初施用量的 11%。

目前环氧虫啉获得的农药临时登记许可主要登记作物为水稻,田间推荐使用剂量为 60~90 g/hm²,按

750 kg/hm² 用水计算,使用有效浓度为 80~120 mg/L。本试验以水稻为测试对象,研究环氧虫啉在水稻体内的稳定性和转化率及其与 NTN32692 在水稻体内随时间变化的累积量,发现随着环氧虫啉施用浓度从 50 mg/L 增加到 200 mg/L,2 种化合物在水稻叶中的累积量都明显增加,当环氧虫啉施药浓度高于 100 mg/L 时,水稻可有效吸收环氧虫啉,并降解转化生成 NTN32692。水稻中进一步的残留动态检测结果表明,当环氧虫啉进入水稻植株后,随着无药培养时间的延长,水稻叶片中环氧虫啉和 NTN32692 的浓度都呈下降趋势,培养 3 d 后分别下降了 29.55% 和 64.18%;培养 7 d 后分别下降了 67.33% 和 89.42%,其中 NTN32692 浓度显著下降可能与其较易发生光降解有关。由于本研究仅进行了环氧虫啉在水稻植株中累积和残留动态检测,未能开展残留药剂对靶标害虫如稻飞虱的防治效果检测,因此在实际施药后环氧虫啉和 NTN32692 对于害虫防治持效期的效果还有待进一步研究。

商品化新烟碱杀虫剂噻虫嗪在昆虫体内可作为前期药剂进行害虫防治。Nauen et al. (2003) 发现噻虫嗪在草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 和棉花中可转变为高活性的噻虫胺,从而有效降低了噻虫嗪与吡虫啉在田间应用上的交互抗性。Bredeson et al. (2015) 发现噻虫嗪在植物体内转化为噻虫胺和其体内的解毒酶密切相关。与噻虫嗪类似,本试验也发现环氧虫啉在昆虫和植物体内会转化为主要产物 NTN32692。NTN32692 具有很高的杀虫活性,但光不稳定性限制了其在农作物保护领域的应用。环氧虫啉表现出活性高、杀虫谱广、毒性低等特点为抗吡虫啉害虫的防治提供了有效的解决方法。因此,环氧虫啉作为新型杀虫剂在害虫防治中施用,对有害生物综合治理具有重要意义(Shao et al., 2013b),而其在生物体内的降解转化研究,进一步说明在田间实际应用中土壤浇灌或种子处理等方式可以有效发挥其在害虫防治中的作用。

参 考 文 献 (References)

- Bass C, Denholm I, Williamson MS, Nauen R. 2015. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121: 78–87
- Bass C, Puinean AM, Zimmer CT, Denholm L, Field LM, Foster SP, Gutbrod O, Nauen R, Slater R, Williamson MS. 2014. The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 51: 41–51
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of pro-

- tein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1/2): 248–254
- Bredeson MM, Reese RN, Lundgren JG. 2015. The effects of insecticide dose and herbivore density on tri-trophic effects of thiamethoxam in a system involving wheat, aphids, and ladybeetles. *Crop Protection*, 69: 70–76
- Cui L, Sun LN, Shao XS, Cao YZ, Yang DB, Li Z, Yuan HZ. 2010. Systemic action of novel neonicotinoid insecticide IPP-10 and its effect on the feeding behaviour of *Rhopalosiphum padi* on wheat. *Pest Management Science*, 66(7): 779–785
- Cui L, Sun LN, Yan DB, Yan XJ, Yuan HZ. 2012. Effects of cyclozaprid, a novel *cis*-nitromethylene neonicotinoid insecticide, on the feeding behaviour of *Sitobion avenae*. *Pest Management Science*, 68(11): 1484–1491
- Ford KA, Casida JE. 2008. Comparative metabolism and pharmacokinetics of seven neonicotinoid insecticides in spinach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21): 10168–10175
- Gao ZS, Zhang XF, Liu HT, Zhang WJ, Mu W. 2016. Feasibility for controlling wheat aphids by seed dressing with neonicotinoid insecticides. *Journal of Plant Protection*, 43(5): 864–872 (in Chinese) [高志山, 张学峰, 刘海涛, 张文娟, 慕卫. 2016. 新烟碱类杀虫剂种子包衣防治麦蚜的可行性评价. *植物保护学报*, 43(5): 864–872]
- Li C, Xu XY, Li JY, Ye QF, Li Z. 2011. Radiosynthesis of tritium-labeled novel nitromethylene neonicotinoids compounds with NaB^3H_4 . *Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals*, 54(5): 256–259
- Liu XQ, Xu XY, Li C, Zhang HX, Fu QG, Shao XS, Ye QF, Li Z. 2015a. Degradation of chiral neonicotinoid insecticide cyclozaprid in flooded and anoxic soil. *Chemosphere*, 119: 334–341
- Liu XQ, Xu XY, Li C, Zhang HX, Fu QG, Shao XS, Ye QF, Li Z. 2016. Assessment of the environmental fate of cyclozaprid in flooded and anaerobic soils by radioisotopic tracing. *Science of the Total Environment*, 543: 116–122
- Liu XQ, Xu XY, Zhang HX, Li C, Shao XS, Ye QF, Li Z. 2015b. Bioavailability and release of nonextractable (bound) residues of chiral cyclozaprid using geophagous earthworm *Metaphire guillelmi* in rice paddy soil. *Science of the Total Environment*, 526: 243–250
- Mao DR. 1994. Research methods of plant nutrition. Beijing: China Agricultural University Press, pp. 16 (in Chinese) [毛达如. 1994. 植物营养研究方法. 北京: 中国农业大学出版社, pp. 16]
- Nauen R, Ebbinghaus-Kintscher U, Salgado VL, Kaussmann M. 2003. Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 76(2): 55–69
- Prabhaker N, Castle S, Henneberry TJ, Toscano NC. 2005. Assessment of cross-resistance potential to neonicotinoid insecticides in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Bulletin of Entomological Research*, 95(6): 535–543
- Simon-Delso N, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Chagnon M, Downs C, Furlan L, Gibbons DW, Giorio C, Girolami V, et al. 2015. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1): 5–34
- Shao XS, Fu H, Xu XY, Xu XL, Liu ZW, Li Z, Qian XH. 2009. Divalent and oxabridged neonicotinoids constructed by dialdehydes and nitromethylene analogues of imidacloprid: design, synthesis, crystal structure, and insecticidal activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(5): 2696–2702
- Shao XS, Liu ZW, Xu XY, Li Z, Qian XH. 2013a. Overall status of neonicotinoid insecticides in China: production, application and innovation. *Journal of Pesticide Science*, 38(1): 1–9
- Shao XS, Swenson TL, Casida JE. 2013c. Cyclozaprid insecticide: nicotinic acetylcholine receptor binding site and metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(33): 7883–7888
- Shao XS, Xia SS, Durkin KA, Casida JE. 2013b. Insect nicotinic receptor interactions *in vivo* with neonicotinoid, organophosphorus, and methylcarbamate insecticides and a synergist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(43): 17273–17277
- Tomizawa M, Casida JE. 2003. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual Review of Entomology*, 48(1): 339–364
- Wu YC, Xu ZP, Shao XS, Cheng JG, Li Z. 2016. Toxicity of cyclozaprid to *Aphis craccivora* (Koch) and its effects on detoxification enzymes. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 18(6): 710–716 (in Chinese) [吴勇超, 须志平, 邵旭升, 程家高, 李忠. 2016. 环氧虫啉对苜蓿蚜的毒力及对其体内解毒酶活性的影响. *农药学报*, 18(6): 710–716]
- Xu HX, Zheng XS, Tian JC, Lai FX, He JC, Lü ZX. 2017. Advances in the development and application of control technologies for insect pest management in paddy fields in China. *Journal of Plant Protection*, 44(6): 925–939 (in Chinese) [徐红星, 郑许松, 田俊策, 赖凤香, 何家春, 吕仲贤. 2017. 我国水稻害虫绿色防控技术的研究进展与应用现状. *植物保护学报*, 44(6): 925–939]
- Zhang J, Cao YQ, Cui L, Qin ZH, Ma YQ, Rui CH. 2015. Toxicity of N'-nitrohydrazinecarboximidamides to several aphids and the influence on the activities of related enzymes in *Aphis gossypii*. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 17(2): 143–148 (in Chinese) [张靖, 曹亚琴, 崔丽, 覃兆海, 马永强, 芮昌辉. 2015. N'-硝基缩氨基胍类化合物对蚜虫的室内毒力测定及相关酶活性的影响. *农药学报*, 17(2): 143–148]
- Zhang J, Fu Q, Wang H, Li J, Wang W, Yang Z, Ye Q, Li C, Li Z. 2013. Enantioselective uptake and translocation of a novel chiral neonicotinoid insecticide cyclozaprid in youdonger (*Brassica campestris* subsp. *chinensis*). *Chirality*, 25(11): 686–691
- Zhang YB, Qian H. 2015. The global marketing and development of six classes of insecticides and new insecticides. *Agrochemicals Today*, (5): 26–32 (in Chinese) [张一宾, 钱虹. 2015. 世界六大类杀虫剂的发展和新研发的杀虫剂品种. *今日农药*, (5): 26–32]
- Zhuang YY. 2014. Study on the hydrolysis and the photodegradation of cyclozaprid in water. Master Thesis. Shanghai: East China University of Science and Technology (in Chinese) [庄英滢. 2014. 环氧虫啉水解及光解稳定性研究. 硕士学位论文. 上海: 华东理工大学]

(责任编辑:李美娟)