

菜粉蝶颗粒体病毒与化学杀虫剂混用 防治菜青虫及其增效机制研究

黄 鸿* 戴冠群

(植保系)

摘要 菜粉蝶颗粒体病毒(PrGV)与多种低浓度的化学杀虫剂混用,对菜青虫的毒力具有明显的增效作用。PrGV 与乙酰甲胺磷混用对菜青虫的防治效果和作物的保护率均优于单用 PrGV 或乙酰甲胺磷,并且混剂中化学杀虫剂的用量也可减少 30%~50%。初步认为 PrGV 感染对虫体乙酰胆碱酯酶(AChE)、多功能氧化酶(MFO)活性的降低是混剂增效的内在原因之一。经 PrGV 感染的 5 龄虫,AChE 活性降低了 37.94%,MFO 活性也下降了 55.37~78.78%。病毒感染也影响到杀虫剂对 MFO 活性的诱导作用。由于 MFO 活性较低,其对药剂的降解力也随之下降,因此有更多杀虫剂可到达作用靶标 AChE,进一步抑制原来活性已较低的感染病毒虫体的 AChE 的活性。

关键词 菜粉蝶颗粒体病毒;乙酰甲胺磷;乙酰胆碱酯酶;多功能氧化酶;增效作用

由于菜青虫对化学杀虫剂抗性的发展^[1]及滥用化学杀虫剂所造成蔬菜及环境污染的日趋严重,菜粉蝶颗粒体病毒(*Pieris rapae* Granulosis Virus, PrGV)作为该害虫防治的重要手段已倍受重视。PrGV 与杀虫剂混用防治菜青虫的研究也得到开展^[2,3]。国外曾报道颗粒体病毒与敌百虫或异狄氏剂混用防治菜粉蝶效果显著,并且在杀虫剂药效降低后,颗粒体病毒仍保持有强的感染力^[4]。PrGV 与杀虫剂的混用,如能扬长避短、互为补充,就能既提高对害虫的防治效果,又减少化学杀虫剂的使用量、降低其对环境的污染。因此 PrGV 与杀虫剂混用的研究,对害虫综合防治实践具有重要意义。但目前关于 PrGV 与化学杀虫剂混用的增效机制未见有报道。为此,本文就 PrGV 与化学杀虫剂混用防治菜青虫及其增效机制进行研究探讨。

1 材料和方法

1.1 供试昆虫

从甘蓝地采回各龄菜粉蝶(*Pieris rapae* L.)幼虫,置于养虫缸内饲养,按需要取4龄或5龄初正常幼虫供试验用。

1.2 供试病毒及杀虫剂

W ₁ -78 粉剂和水剂	武汉大学病毒研究所生产
90%乙酰甲胺磷晶体	江门农药厂生产
40%乙酰甲胺磷乳油	花县农药厂生产

* 1985—1988 年研究生,现在广东省昆虫研究所工作。

1989-03-13 收稿

90%敌百虫晶体	广州农药厂生产
25%杀虫双水剂	广州农药厂生产
50%巴丹可溶性粉	日本武田农药厂生产
25%西维因可湿性粉剂	无锡农药化工厂生产
80%杀灭菊酯原药	中山石岐农药厂生产
YZ-DBE 助剂	广州有色金属院生产

1.3 混用增效性筛选试验方法

按表1所列浓度配制各药液,把约50 cm²甘蓝叶片在相应药液中浸渍晾干置于∅9.5 cm 垫有滤纸的培养皿内,接入4~5龄菜青虫10头。每处理重复3次,设清水处理作对照。结果用Abbott's公式求校正死亡率;用协同青力因子(Cototoxicity factor, C. f. 值)^[2,17]估算混用的增效性。

1.4 田间小区药效试验方法

按表2所示浓度配制PrGV液,乙酰甲胺磷液及其混配剂。并在所有药剂中加入0.05%展着剂YZ-DBE。芥蓝试验小区采用随机区组方法排列,每处理3个重复,设空白对照区。供试面积0.5亩,每区定点10株,定期调查虫口密度;处理后14 d估算受害程度,计算叶面受害指数^[9]。

1.5 酶活性测定方法

1.5.1 供试虫的处理 供试虫:田间采回的刚脱皮的5龄菜青虫。处理方法:对照用洗净、晾干的新鲜甘蓝叶喂3 d;PrGV处理:用 3.18×10^{10} GIB/l病毒液涂布甘蓝叶,饲喂3 d;乙酰甲胺磷处理:新鲜叶片饲喂48 h后,转用涂有133.33 ppm乙酰甲胺磷的叶片继续喂食24 h;PrGV与乙酰甲胺磷联合处理:先用病毒(3.18×10^{10} GIB/l)处理叶喂48 h,然后转用乙酰甲胺磷(133.3 ppm)处理叶继续喂24 h。

1.5.2 酶的制备 各处理用虫14头,先取其头部用5 ml生理盐水(1.15%KCl)在冰浴中匀浆,然后离心20 min(4 000 r/min),取上清液作为酶源供乙酰胆碱酯酶(AChE)活性测定;然后把14头虫的中肠用冰浴生理盐水洗净、匀浆,用1.15%KCl定容为3 ml作为多功能氧化酶(MFO)活性测定的酶源。

1.5.3 乙酰胆碱酯酶活性的测定 根据Ellman等^[12]的方法。基质为 4.5×10^{-3} mol/L乙酰硫代胆碱(ASCh),显色剂为 2.5×10^{-3} mol/L二硫双对硝基苯甲酸(DTNB)。反应物包括酶源250 ml、pH7.4磷酸缓冲液1.25 ml、ASCh-DTNB等份混合物(v/v)1 ml。反应在27℃水浴中恒温15 min,加入抑制剂毒扁豆碱1 g/L 2滴终止反应,以721型分光光度计在412 nm波长下测定光密度。以不同量的健康菜青虫酶液进行反应制作标准曲线。

1.5.4 多功能氧化酶活性测定 参照Wilkinson^[22]及黄彰欣^[5]方法,利用多功能氧化酶的环氧化作用对其活性进行测定。每一试样加入4.3 ml反应混合物(12 ml 1.15% KCl;75 ml 0.1 mol/L Tris-HCl)缓冲液,pH7.8;57 mg EDTA;111 mg G-6-P;0.5 ml酶液;0.2 ml NADP⁺液;G-6-P脱氢酶液1滴。恒温(32℃)振摇10 min,加入2 ml艾氏剂底物溶液(1×10^{-7} g/L)。在32℃下恒温振荡,准确反应10 min。加入3 ml丙酮终止反应,然后脱水并用正己烷反复抽提,定容为10 ml。反应生成的狄氏剂在国产SP-

2305 型气相色谱仪上进行测定。标准曲线用狄氏剂制作。检测器: ^{63}Ni 电子捕获仪;色谱柱:玻璃色谱柱 1.95%QF-1+1.5%OV-17, Chromsorb AW80-100 目制备;柱温 210℃、检测器 280~290℃,汽化室 250℃;载气(N_2 :99.999%):55 ml/min;进样量 5 μl 。蛋白含量采用 Lowry(1951)^[16]法进行定量。

表1 PrGV 与几种杀虫剂混用的增效试验*

混配 药剂	配比浓度		累计死亡率(%)		校正死亡率(%)		c. f 值	
	PrGr× 10 ³ GIB/L	杀虫剂 (ppm)	3 d	5 d	3 d	5 d	3 d	5d
杀灭 菊酯	0	20	70.00	80	65.39	75	—	—
	1.86	12.36	73.33	100	69.23	100	35.24	53.53
	3.02	7.64	93.33	100	92.30	100	115.58	36.60
巴丹	0	250	83.33	100	80.77	100	—	—
	1.86	154.3	96.67	100	96.16	100	67.89	33.02
	3.02	95.5	80.00	100	76.92	100	62.64	36.60
杀虫双	0	250	70.00	100	65.39	100	—	—
	1.86	154.5	96.67	100	95.16	100	47.84	33.02
	3.02	95.5	86.67	100	84.62	100	94.64	36.60
乙酰 甲胺磷	0	300	73.33	73.33	69.23	66.67	—	—
	1.86	185.4	93.33	100	92.30	100	80.30	61.85
	3.02	114.6	80	96.67	76.92	95.85	75.08	41.61
敌百虫	0	1800	76.67	100	73.08	100	—	—
	1.86	1112.4	53.33	86.67	46.15	83.34	-13.29	10.86
	3.02	687.6	63.33	100	57.69	100	28.05	36.60
西维因	0	500	100	100	100	100	—	—
	1.86	309	83.33	90	80.71	87.50	19.81	16.39
	3.02	191	66.67	96.67	61.54	95.85	16.35	30.93
PrGV	4.88	0	46.63	93.33	38.47	91.66	—	—
对照 (CK)	0	0	13.33	20	—	—	—	—

* 1. 各处理供试菜青虫 30 头,重复 3 次;2. 试验期间日平均温度 25℃(17~30℃);3. c. f. 值≤-20 表明混用减效,为拮抗作用;-20<c. f. 值<20 表明混用药剂出现相加作用;c. f. 值≥20 表明混用为增效作用。

2 结果与分析

2.1 混用增效性筛选试验结果 PrGV 与 6 种化学杀虫剂混用对 4~5 龄菜青虫的药效测定结果见表 1。PrGV 与供试的 6 种杀虫剂混配,c. f. 值均大于-20,即混用无一例

表现为拮抗作用。与病毒混用,增效较显著的有杀灭菊酯、巴丹、杀虫双、乙酰甲胺磷等4种,在试验的两个混合配比浓度下,其c.f.值3d和5d都大于20。687.6 ppm敌百虫与PrGV(3.02×10^6 GIB/L)混用,c.f.值亦高于20。结果表明,PrGV与供试的分别属于除虫菊酯类、沙蚕毒素类、有机磷类、氨基甲酸酯类的6种杀虫剂混用均具有增效或相加作用,混用增效性与配比浓度有关。

2.2 混用制剂的田间小区药效试验结果 混剂在芥蓝地防治菜青虫的药效试验结果如表2。从表2可见,PrGV与乙酰甲胺磷混用(2.12×10^6 GIB/L+160 ppm)后,虫口减退速率明显加快,对虫口密度的控制力大大增强,其3d的虫口减退率达84%,10d达92%。防治效果甚至明显优于较高浓度的化学杀虫剂单用,乙酰甲胺磷(266.7 ppm)单用10d后的虫口减退率仅为57.14%。PrGV单用表现出来的防效则较为缓慢,使用后5d才逐渐看出效果。从14d的叶面保护效果看,混剂达81.82%,266.7 ppm、160 ppm乙酰甲胺磷单用分别为63.64%和54.54%,PrGV单用仅为18.18%,混用明显优于病毒单用,也略优于乙酰甲胺磷单用,但统计分析表明,与乙酰甲胺磷单用比较,混用对叶面的保护效果的提高还未达显著。

表2 不同处理对菜青虫防治效果比较*

处 理	浓 度	虫 口 基 数	虫 口 减 退 率(%)			叶面 受害指数 (%)	保护效果 (%)
			3 d	5 d	10 d		
40%乙酰 甲胺磷	1:1 500 (0.026 7%)	56	78.57	57.14	57.14	33.33 ^a	63.64
	1:2 500 (0.016%)	74	45.94	51.35	56.76	41.67 ^a	54.54
PrGV+ 乙酰甲胺磷	1.54×10^6 GIB/ml +0.016%	50	84.00	84.00	92.00	16.67 ^a	81.82
PrGV	2.12×10^6 GIB/ml	64	3.13	46.88	81.25	75.00 ^b	18.18
CK	0	42	-38.10	-21.43	0	91.67 ^b	0

* 1. 每处理3个小区重复,每小区定点调查10株芥蓝;2. DMRT法, $P=0.05$ 水准下,差异显著;3. 保护效果(%)=(对照区受害指数-处理区受害指数)×100/对照区受害指数。

2.3 不同处理对5龄菜青虫体内乙酰胆碱酯酶(AChE)活性的影响 一般认为,乙酰胆碱酯酶为有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的作用靶标,即这两类杀虫剂主要是通过抑制AChE而发挥作用的^[4,23]。因此,了解混剂对AChE活性的影响有助于解释PrGV与乙酰甲胺磷等混用增效现象。测定结果表明(表3),5龄病虫AChE活性有极显著的下降,其活性只有正常虫的62.06%。单用乙酰甲胺磷组,AChE活性也只有正常虫的43.09%,显然这种活性下降是由于杀虫剂对AChE活性的抑制作用。PrGV与乙酰甲胺磷联合处理组,AChE活性下降幅度更大,仅为正常虫的29.06%,明显低于单用乙酰

甲胺磷处理组。

2.4 不同处理对菜粉蝶5龄幼虫多功能氧化酶(MFO)活性的影响 多功能氧化酶活性水平测定结果见表4。结果显示,添食病毒处理叶后,虫体MFO活性水平与同批的对照虫相比明显下降,活性仅是正常虫的21.21%~44.64%。而经乙酰甲胺磷处理者,MFO活性水平极显著地提高,活性达 $1.0005 \times 10^{-13} \text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg} \text{ 蛋白})$,比对照组提高116.62%。在使用乙酰甲胺磷处理前,先用病毒处理叶对菜青虫进行添食处理,其MFO的活性提高幅度大大降低,与第1批处理对照虫相比MFO活性无明显差异,这说明,乙酰甲胺磷对虫体的微粒体氧化酶系具有很强的诱导作用,而当用PrGV处理后,这种诱导作用就被大大削弱了。

表3 不同处理对菜青虫体内乙酰胆碱酯酶活性(O.D值相对值)影响比较

测定日期	处 理 O.D 值 重复	对 照	PrGV	乙酰甲胺磷	PrGV+乙酰 甲胺磷
3月5日	1	0.131 0	0.088 5		
3月5日	2	0.121 5	0.087 5		
3月13日	3	0.129 0	0.101 5	0.076 0	0.068 5
3月13日	4	0.137 0	0.099 0	0.079 5	0.061 5
3月27日	5	0.130 0	0.099 0		
平均值		0.129 7Aa	0.095 1Bb	0.077 8Cc	0.065 0Cd
酶量(μl)		236.269 4	146.632 1	101.813 5	68.652 8
相对活性(%)		100	62.06	43.09	29.06

* 1. LDS法,用大写字母表示 $P=0.01$ 的差异显著性;用小写字母表示 $P=0.05$ 的差异显著性。

2. 相对活性(%)=处理的酶量 $\times 100$ /对照的酶量

表4 不同处理对菜青虫多功能氧化酶(MFO)活性的影响

处 理*	MFO 活 性		相对活性 (%)
	$\times 10^{-14}\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg 蛋白})$	$\times 10^{-14}\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{头})$	
第一批			
对 照 1	7.678 1 B	7.926 8 B	100
PrGV 1	1.629 2 D	2.290 3 E	21.21
对 照 2	4.618 5 C	5.922 7 C	100
PrGV 2	2.061 1 D	3.981 2 D	44.64
乙酰甲胺磷	10.004 6 A	11.909 9 A	216.62
PrGV+乙酰甲胺磷	7.621 9 B	7.237 9 BC	165.03

* 每处理重复4次;LSD法, $P=0.01$ 水准,差异极显著。

3 讨论

菜粉蝶颗粒体病毒与低浓度的乙酰甲胺磷等杀虫剂混用具有明显的增效作用。PrGV 与乙酰甲胺磷混用对作物的保护效果显著优于 PrGV 单用。而且与病毒混用,化学杀虫剂的使用量也可减少约30%~50%,这对发挥病毒的防治作用、降低农药残留量和蔬菜害虫的综合防治具有重要意义。

病毒与化学杀虫剂混用问题前人有过大量探讨^[3,7,9~15,18~21]。然而关于混用的增效机制问题还未见报道。本文首次从解毒酶系微粒体多功能氧化酶(MFO)和有机磷、氨基甲酸酯类的主要作用靶标乙酰胆碱酯酶(AChE)的角度就 PrGV 对虫体抗药性的影响进行探讨。据报道,菜青虫的中肠体壁、脂肪体、气管和马氏管等组织器官均可受到病毒的感染^[1]。这些组织器官与杀虫剂的渗透、分解代谢和排泄作用有关;参与各种杀虫剂(包括有机磷、有机氯、氨基甲酸酯、除虫菊酯类、化学不孕剂和昆虫激素等)的解毒作用,在杀虫剂代谢中起中心作用的(MFO)就主要存在于中肠、脂肪体和马氏管中^[4,6,23]。本试验结果表明,感病菜青虫 MFO、AChE 活性水平大大降低,杀虫剂乙酰甲胺磷对其 MFO 诱导作用也明显减弱,而对其 AChE 活性的抑制作用则大大增强。因此,混用增效的可能机制是:病毒感染一方面可破坏虫体体壁、中肠等器官的功能结构,影响杀虫剂的渗透、排泄;另一方面也可影响靶的 AChE 的活性及 MFO 对杀虫剂的降解力,通过这些影响可使更多的杀虫剂乙酰甲胺磷到达作用靶的 AChE,进一步抑制其活性。可以认为,使虫体抗药性下降是 PrGV 与多种杀虫剂混用对菜青虫具有增效潜力的重要原因。

致谢 本研究的部份实验承蒙植保系黄彰欣副教授支持和协助,武汉大学病毒研究所提供了菜粉蝶颗粒体病毒制剂,植保系戴博周和莫美华同学参加部分药效试验,在此一并鸣谢。

参 考 文 献

- 1 武汉大学病毒研究所等. 中国昆虫病毒图谱. 长沙:湖南科学技术出版社,1986. 78~80
- 2 姚湘江. 杀虫剂混配制剂药效的估计. 植物保护,1983,9(3):19~20
- 3 高日霞等. 建阳株菜粉蝶颗粒体病毒(PrGV J₁-81)生物测定及其应用. 福建农学院学报,1983,12(2):141~151
- 4 唐振华,黄刚. 农业害虫抗药性. 北京:农业出版社,1982. 83~132
- 5 黄彰欣. 植物性药物及增效剂对秋粘虫微粒体的氧化酶活性及药物相关效应. 华南农业大学学报,1984,5(3):28~38
- 6 龚坤元等. 杀虫药剂与昆虫毒理进展(2). 北京:科学出版社,1983. 123~138
- 7 梁东瑞. 物化因子对小菜粉蝶颗粒体病毒感染力的影响. 昆虫知识,1983,20(2):73~75
- 8 慕立义等. 菜青虫抗药性的调查与研究. 植物保护学报,1984,11(4):267~272
- 9 阿久津喜作. 颗粒病ウイルスにするモンシロチョウ幼虫の防除. 応動昆,1971,15(2):56~62
- 10 Benz G. Synergism of micro-organisms and chemical insecticides. In: Microbial control of insects and mites, H. D. Burges and N. W. Hussey (eds.), New York: Academic Press, 1971. 327~355
- 11 Chaudhari S, et al. Field efficacy of baculovirus and its combination with sub-lethal dose of DDT and endosulfan on cauliflower against tobacco caterpillar, *Spodoptera litura* (Fabricius) Indian J. Entomol.,

- 1980,42(4):592~596
- 12 Ellman G, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharm.*, 1961, 7: 88
- 13 Hunter D K, et al. Compatibility of malathion and the granulosis virus of the Indian meal moth. *J. Invertebr. Pathol.*, 1975, 25(3): 389~390
- 14 Inoffo C M, et al. The effects of chemical insecticides and insecticidal adjuvants of a *Heliothis nuclear*—polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.*, 1966, 8: 409~412
- 15 Jaques R P. Tests on microbial and chemical insecticides for control of *Trichoplusia ni* and *Pieris rapae* on cabbage. *Can. Entomol.*, 1973, 105: 21~27
- 16 Lowry D H, et al. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193: 265
- 17 Mansour N A, et al. Toxicological studies on the Egyptian cotton leafworm, *Prodenia litura*. VI. potentiation and antagonism of organophosphorus and carbamate insecticides. *J. Econ. Entomol.*, 1966, 59: 307~311
- 18 Richter A R, et al. Pathogen—pathogen and pathogen—insecticide interactions in velvetbean caterpillar (Lep. :Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 1984, 77(6): 1559~1564
- 19 Rud E W, et al. Efficacy of combinations of polyhedrosis viruses and permethrin against the white cutworm, *Euxoa scandens* (Riley) (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 1984, 77(4): 989~994
- 20 Smith D B, et al. Laboratory and field evaluation of pathogenadjuvant treatments. *J. Econ. Entomol.*, 1982, 75(3): 472~476
- 21 Tompkins G J, et al. Effectiveness of microbial and chemical insecticides for controlling cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae) and imported cabbage worm (Lepidoptera: Pieridae) on collards in Maryland. *J. Econ. Entomol.*, 1986, 79(2): 497~501
- 22 Wilkinson C F, et al. Microsomal mixed—function oxidases in insects. *Biochem. Pharmac.*, 1969, 18: 1403
- 23 Wilkinson C F. Insecticide biochemistry and physiology. New York and London: Plenum Press, 1976, 768

STUDIES ON THE SYNERGISM OF *PIERIS RAPAE* GRANULOSIS VIRUS AND INSECTICIDES

Huang Hong Dai Guanqun

(Department of Plant Protection)

Abstract Of 6 insecticides (fenvalerate, cartap, dimehyopo, acephate, trichlorphon, sevin) laboratory tested, all of them in low concentrations when mixed with *Pieris rapae* GV were far more effective than insecticides or GV used alone. The results of field plot experiments also showed that a mixture of granulosis virus and acephate was more effective against the imported cabbage worm than either material alone. The protection effect to the cabbage leaf increased 33.34% and 77.78% when the PrGV + acephate (1.53×10^8 GIB/l + 160 ppm) was compared with higher concentration of acephate (250 ppm) and 2.12×10^8 GIB/l used alone. This increase was significant when compared with the insecticide used alone at the 5% level.

Further studies on the physiological and biochemical basis for the synergism of the mixture showed that the activity of cholinesterase (possibly including isoenzymes) in the larvae infected by PrGV and the larvae treated with PrGV—acephate, decreases 37.94% and 70.94% when compared with the check. These decreases were significant at the 1% level. The activity of microsomal mixed—function oxidases (MFO) showed 55.37%—78.78% reduction for the larvae affected with PrGV when compared with the check, as well as 116.62% enhancement of the activity of MFO with acephate treatment alone. The activity of MFO of PrGV—acephate treatment was only 65.03% enhancement to the check, far less than that of the acephate treatment alone. Due to the lowered activity of MFO, its ability for degrading insecticides would be decreased, and more insecticide (eg. acephate) could reach the target (eg. cholinesterase). According to the results of biochemical analysis, PrGV application could decrease the insecticide resistance of the imported cabbage worm population, making acephate and other insecticides more effective.

Key words *Pieris rapae* granulosis virus (PrGV); Acephate; synergism; Cholinesterase; Microsomal mixed—function oxidases (MFO)