杀虫药剂生物测定技术专题

杀虫药剂生物测定原理与实践*

辛娟娟 高希武**

(中国农业大学昆虫学系 北京 100193)

摘 要 本文从生物测定的基本原理、试验靶标的选择、杀虫药剂毒力测定标准化和统计分析等方面对杀虫药剂的毒力测定进行了规范性综述,为进行标准的生物测定提供依据和参考。

关键词 杀虫药剂,生物测定,昆虫,统计分析

General principles and practice for insecticide bioassays

XIN Juan-Juan GAO Xi-Wu**

(Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract General principles, the selection of pest targets, standardization of assay procedures and biological statistics for the analyses of insecticide bioassays are reviewed. This review will provide a reference for developing standard insecticide bioassays.

Key words insecticide, bioassay, pest target, biological statistics and analysis

1 生物测定的基本原理

生物测定(bioassay)通常包括度量刺激源对生物群体、个体、组织或细胞产生效应的大小和利用生物产生的这些反应来度量刺激源暴露的量两个方面(Robertson *et al.*,2007)。一般我们谈到的杀虫药剂的生物测定多数情况下是评价杀虫药剂的生物活性。

生物测定包括刺激、试验生物和生物产生的反应3个方面,本文的刺激就是杀虫药剂。由剂量和时间两个方面决定刺激的强度,也就是时间-剂量积决定了刺激强度。试验生物的选择主要决定于试验的目的。生物产生的反应可以分为数量反应和量子反应,数量反应如某种酶或呼吸速率的抑制率等,量子反应多是以死或活作为标准。对于量子反应,不同的药剂和试验生物的组合有一个限阈值,传统的生物测定多属于量子反应,也是目前应用最为广泛的。

狭义的杀虫药剂生物测定往往和杀虫药剂毒力测定是一致的。杀虫药剂毒力测定和田间药效试验、毒性与毒效并不一定有完全一致的对应的关系。

2 试验靶标的选择

常用的试验昆虫可以分为两大类,一类是标准的试验昆虫用于新药剂创制时的筛选;另一类是与田间实际防治对象相同或近缘的昆虫用于确定田间防治对象防治前的药剂筛选。

毒力测定用的试验昆虫对其发育阶段(卵期、幼虫及若虫龄期、蛹期、成虫期)、性别与生殖、生理因素、越冬及季节性差异、脂肪含量、体重、新陈代谢与呼吸率、种群的异质性等都有一定的要求。

环境条件有时对毒力测定的结果影响比较大。特别是温度的影响,许多化合物的毒力发挥具有温度效应。温度包括处理前及饲养的温度、处理时的温度、处理后的温度等。另一方面湿度和光照有时也具有比较大影响。昆虫体内的生理生化过程具有时间节律,例如有些昆虫细胞色素

* 资助项目:国家大麦青稞产业技术体系和公益性行业(农业)科研专项-公益性行(农业)科研专项(201203038)。

** 通讯作者,E-mail: gaoxiwu@263.net.cn

收稿日期:2013-03-06,接受日期:2013-03-12

P450 活性会受到光照和黑暗节律的影响。

3 杀虫药剂毒力测定标准化

3.1 明确试验目的

试验前应该确定为什么做这个试验。例如为了确定两个药剂混用的最佳配比时,试验设计时要包括两个单剂和两个药剂混合的系列比例;确定新药剂的活性时,对照药剂要选择用于该对象防治的结构类似的药剂或常用品种或公认的用于该虫种防治的药剂。

3.2 依据药剂性质选择适合的生物测定方法

生物的测定方法的选择对于正确评价一个药剂的生物活性是至关重要的。例如触杀活性测定的点滴法、药膜法等;胃毒活性测定的叶片夹毒法等;内吸活性测定的幼苗水培法等;熏蒸活性测定的真空干燥器法、钟罩法等;混合作用方式测定的浸虫法、培养基混药法等。

注意不同测定方法的特点。点滴法:溶剂的选择一般为丙酮,有些在丙酮中溶解度低的药剂可以加一定比例的其它有机溶剂;点滴不熟练的人员可以考虑在丙酮中加一定比例的丁酮以便减少挥发的速度。药膜法:药膜的基质为玻璃表面或滤纸表面时,应选用有机溶剂形成药膜,溶剂的选择一般为丙酮,有些丙酮中溶解度低的药剂可以加一定比例的其它有机溶剂;药膜的基质为植物叶片时,应选用以水为连续相的溶液,溶液中除了依据药剂的性质加少量有机溶剂外,要有标准的表面活性剂(0.1% ~1%)。叶片的浸渍时间一般为 10 s 左右,然后阴干。

常见的测定方法(或类型)有:(1)触杀活性测定:点滴法、药膜法(玻璃药膜法、滤纸药膜法等)、喷雾法(Potter 喷塔)、浸渍法;(2)胃毒活性测定:叶片夹毒法、培养基混药法;(3)内吸活性测定:根部吸收法、叶片吸收法、茎部内吸法、种子吸收法;(4)熏蒸活性测定:钟罩法、真空干燥器法、静态法、动态气流法;(5)不育活性的测定:口服处理、滴加处理、微量注射、浸液法、药膜接触法、喷雾、喷粉和气雾法、熏蒸法和真空熏蒸法、低压蒸馏法;(6)引诱活性的测定:嗅觉计及其应用;(7)土壤杀虫剂活性测定:拌土法、土壤熏蒸剂(熏蒸瓶);(8)防护剂的测定:纺织品保护剂的毒力测定、粮食包装物的保护剂的毒力测定;(9)动物内疗剂的活性测定:各种标准动物的测定方法、用人工膜(动物膜)的测定方法(张宗炳,1988)。

3.3 试验昆虫的标准化

一般要选择和防治对象同种的试虫进行室内试验,特殊情况下可以选择近似种或同属;试虫的发育阶段要与田间需要防治的虫态接近;试虫的虫龄、个体大小(体重等)、生理年龄要一致;一般要求室内饲养一定时间的试虫作为虫源,特殊的试虫养殖困难可以考虑室内饲养一代或两代或从田间采集卵块待孵化出幼虫用于试验(注意要多个卵块的幼虫随机混合后用于测定)。直接用田间虫源测定时需要很大的样本容量,一般不推荐(特殊情况除外,例如某些介壳虫等)

3.4 结果观察标准化

死亡的标准要一致,特别是不是一个人检查结果时;检查结果的时间要依据药剂的性质定,一般从几个小时到几天不等,对于昆虫生长调节剂以及昆虫病原微生物一般要在 72 h 以上;记录非观察指标以外的现象。

4 统计分析

生物测定统计分析主要原理是依据机值分析。正确的生物学现象观察和不正确的统计分析或者正确的统计分析和生物学测定本身理论的不正确性都会得出不正确的结论,因此试验数据的合适的统计分析对于正确评价一个药剂的生物活性是非常重要的。不同的观察指标或方式采用的统计分析方法会有区别(例如时间-死亡率关系的独立观察和连续观察结果的差异)。对照死亡率原则上不应该太高,一般小于 5% 可以不进行校正,大于 5% 要校正,大于或等于 20% 视为无效测定;如果是观察羽化率时,羽化率至少要大于等于 80%。

由于成活率、死亡率、孵化率等是服从二项式分布的,而机值分析是基于正态分布进行的。只有当样本量 n 较大,p 不过小,且 np 和 nq 均大于 5 时,二项式分布才接近于正态分布。

为了准确估价 LD_{50} 值(LC_{50}),样本容量 n 是一个关键的因子,一般最低不能小于 120,至少要有 3 个剂量组。死亡率分布在 25% ~75% 时,得到的 LD_{50} 值(LC_{50})是最精确的。如果准确估计 LD_{90} 值(LC_{90}),至少有 1 或 2 个剂量死亡率

≤10%,死亡率分布在 75% ~95% 最准确,但是考虑到 LD_{50} 值(LC_{50})的获得,至少有一组死亡率要低于 50%。

一般要求测定药剂要有 5 个或 5 个浓度以上,每个浓度要至少有 3 个重复,检查结果时 3 个重复的数据不要合并,每个重复单独进入机值分析;一般采用机值分析处理数据,提取特征值 LC_{50}(LD_{50})及其置信限、LC_{95}(LD_{95})及其置信限、b 值及其标准误差等。LC_{50}(LD_{50})是药剂间毒力比较或同一药剂对不同种群毒力最重要的参数,因为从统计学角度分析 LC_{50}(LD_{50})是置信区间最窄的部位。

目前机值分析有许多软件可以完成,例如 SAS(SAS Institute,2002)、POLO (LeOra Software, 2006)等。

5　结语

关于生物测定方法的规范,FAO(例如 Robertson,1980)、WHO、国际杀虫药剂抗性行动委员会、EPPO、我国农业部农药检定所和卫生部病媒生物控制标委会等都根据需要制定了相应的技术规范。一个好的生物测定应该具备以下特征:(1)具有可重复性;(2)结果具有可视性和可度量性;(3)相对低的费用;(4)测定持续时间短(以便减少非相关因子影响的机会),短时间内可以多次重复。

参考文献(References)

Busvine JR, 1980. Recommended Methods for Measurement of Pest Resistance to Pesticides, FAO Plant Production and Protection Paper 21, Rome, Italy.

LeOra Software, 2006. POLO-Plus. A User's Guide to Probitor Logit Analysis. LeOra Software, Berkeley, CA.

Robertson JL, Russell RM, Preisler HK, Savin NE, 2007. Bioassays with Arthropods (Second Edition), Boca Raton, London, New York: CRC Press. 199.

SAS Institute, 2002. User's Manual version 8.0. SAS Institute, Cary, N.C.

张宗炳, 1988. 杀虫药剂的毒力测定:原理方法应用. 北京:科学出版社. 1 -487.