

常用杀虫剂和杀菌剂对褐飞虱类 酵母共生菌生长的影响*

陈建明¹, 何月平¹, 张珏锋¹, 李娜¹, 陈列忠¹, 俞晓平²

(1. 浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所, 杭州 310021;

2. 中国计量学院生命科学学院, 杭州 310018)

摘要 本文研究了常用杀虫剂和杀菌剂对褐飞虱类酵母共生菌生长的影响。结果表明, 10%吡虫啉可湿性粉剂、48%毒死蜱乳油、10%溴氰菊酯乳油、25%噻嗪酮可湿性粉剂、1.2%印楝素乳油、75%百菌清可湿性粉剂、20%三环唑可湿性粉剂的500、1 000、2 000倍液处理后共生菌的生长(菌落数量)显著减少, 共生菌的假菌丝生长不舒展, 有所萎缩, 酵母多形成空泡。浓度越高、共生菌生长受到抑制越显著。低浓度(常规推荐剂量及以下)井冈霉素对共生菌生长影响较小, 而高浓度(2倍常规推荐剂量)处理影响很大。这说明常用杀虫剂和杀菌剂农药对褐飞虱类酵母共生菌的生长均有较大的抑制作用。

关键词 杀虫剂; 杀菌剂; 褐飞虱; 类酵母共生菌; 生长

中图分类号: S 433.3; S 435.112.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2009.06.010

Effects of insecticides and fungicides on growth of endosymbiotes isolated from the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*

Chen Jianming¹, He Yueping¹, Zhang Juefeng¹, Li Na¹, Chen Liezhong¹, Yu Xiaoping²

(1. Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of

Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China;

2. College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract The effects of insecticides and fungicides on growth and development of endosymbiotes in the brown planthopper (BPH), *Nilaparvata lugens* Stål, were studied in the paper. The results showed that after treated with different concentrations (500, 1000, 2000 times) of 10% imidacloprid WP, 48% chlorpyrifos EC, 10% deltamethrin EC, 25% buprofezin WP, 1.2% azadirachtin EC, 75% chlorothalonil WP and 20% tricyclazole WP, the colony number of symbiotes were significantly reduced, and pseudohyphal growth of symbiote did not stretch and had a little shrink, and the yeast mostly became vacuoles. The higher the concentration was, the more inhibition the symbiote growth was subjected to. Recommendation dose of 5% jinggangmycin AS treatment had no significant influence on the endosymbiotes, but the fungicide at two times recommendation dose had stronger inhibitory role to growth and development of endosymbiote isolated from the BPH. These data showed that these pesticides had inhibitory roles of different degrees on growth and development of the symbiotes in the BPH.

Key words insecticides; fungicides; *Nilaparvata lugens*; endosymbiotes; growth

褐飞虱(*Nilaparvata lugens* Stål)是我国及东南亚许多国家水稻生产的主要害虫之一, 是影响水稻稳产高产的重要害虫。目前生产上, 化学农药仍

是防治褐飞虱的主要手段。但是, 由于化学杀虫剂的大量频繁使用, 褐飞虱对常规杀虫剂产生抗药性, 导致化学防治失败, 造成褐飞虱大发生, 2005年全

收稿日期: 2009-02-09 修订日期: 2009-06-29

基金项目: 国家自然科学基金(30771411); 浙江省自然科学基金(Y307125)

* 致谢: 本论文在试验过程中得到浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所夏湛恩研究员的指导, 中国计量学院生命科学学院李群飞、赵瑶娜、沈琳同学参与试验, 在此表示衷心感谢!

国各稻区褐飞虱大发生的主要原因之一是褐飞虱对新烟碱类杀虫剂—吡虫啉产生高度抗药性,其抗药性增加了 70~475 倍^[1]。因此,延缓和治理褐飞虱的抗药性是我省水稻生产中急需解决的重要课题。

研究表明,同翅目昆虫如飞虱、蚜虫、叶蝉等体内普遍存在共生菌,这些共生菌与寄主昆虫互惠互利、协同进化,在昆虫的生长发育、繁殖过程中起着十分重要的作用^[2-3]。褐飞虱共生菌是一种类酵母菌(yeast-like symbiotes,简称 YLS),通常存在于腹部脂肪体内^[4-5],营芽孢生殖,并以卵母细胞垂直传递的方式直接传给子代。外界逆境因子如抗生素、高温、有机磷药剂等能明显抑制褐飞虱体内共生菌的数量^[6-8],烟碱、印楝、甲基嘧啶磷、芸香苷等外源化合物能诱导烟草甲(*Lasioderma serricorne*)体内类酵母共生菌(*Symbiota phrina kochii*)的羧酸酯酶活性^[9-10],说明体内共生菌可能在害虫抵御外界逆境因子过程中产生作用。但上述研究未曾涉及农药对害虫类酵母共生菌生长的影响。为此,本文系统地测定了常用杀虫剂和杀菌剂对褐飞虱类酵母共生菌生长的影响,以期为合理解释褐飞虱对杀虫剂的抗药性机理提供新的途径。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种

褐飞虱共生菌:来源于浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所从褐飞虱体内分离纯化的菌株,编号为 33 号共生菌株——解脂假丝酵母(*Yarrowia lipolytica*)。

1.1.2 供试药剂

杀虫剂:10%吡虫啉可湿性粉剂(潍坊市瑞星农药有限公司生产)、48%毒死蜱乳油(美国陶氏益农公司生产)、10%溴氰菊酯乳油(拜耳作物科学有限公司生产)、5%氟虫腈悬浮剂(拜耳作物科学有限公司生产)、25%噻嗪酮可湿性粉剂(常州农药厂生产)、25%速灭威可湿性粉剂(常州农药厂生产)、1.2%印楝素乳油(浙江省农科院植物保护与微生物研究所)。杀菌剂:5%井冈霉素水剂(浙江省桐庐汇丰生物化工有限公司生产)、20%三环唑可湿性粉剂

(东阳市东农化工有限公司生产)、75%百菌清可湿性粉剂(北京华戎生物激素厂生产)。

1.2 方法

1.2.1 药剂对褐飞虱共生菌生长影响的测定方法

试验在培养皿中进行,将离体培养的褐飞虱共生菌原菌液稀释成 10^{-3} 倍,加 1.5 mL 菌液至装有 150 mL 培养基(已配制好)的锥形瓶中,摇匀,使菌液的总稀释度为 10^{-5} 。每种药剂设置 3 个浓度,每处理重复 3 次。每个浓度用无菌水稀释配制 10 mL 装入试管中。取 1 mL 各浓度药剂于培养皿中,加入 9 mL 混有共生菌的培养基,迅速摇匀。对照以 1 mL 蒸馏水代替药剂。待琼脂凝固后,将培养皿移到瓷盆上,放入 26 °C 恒温培养箱进行培养,第 2 天翻转平板,分别于 2、3、4 d 后观察共生菌的生长情况,记录菌落数,分析不同农药对共生菌的生长抑制作用。

1.2.2 共生菌菌丝体形态的镜检

取一洁净载玻片,用接种环沾无菌水于载玻片上,挑取少许不同农药处理的酵母菌苔于载玻片的水滴中,涂片、热固定后,加一滴结晶紫溶液,并用盖玻片覆盖,1~2 min 后水洗(水不得直接冲在涂菌处),用吸水纸吸干,待制片干燥后,于显微镜下观察^[11]。

2 结果与分析

2.1 杀虫剂对类酵母共生菌生长的影响

试验结果见表 1。可以看出,不同杀虫剂不同浓度处理后 2、3 d 和 4 d,褐飞虱共生菌的菌落数量显著(或极显著)少于对照清水处理,其中 10%吡虫啉可湿性粉剂、48%毒死蜱乳油、10%溴氰菊酯乳油、25%噻嗪酮可湿性粉剂的 500 倍液(2 倍推荐浓度)、1 000 倍液(推荐浓度)、2 000 倍液(1/2 倍推荐浓度)处理后共生菌的菌落数量极显著减少,浓度越高、菌落数量减少越显著,也就是说共生菌生长受到抑制越严重;25%速灭威可湿性粉剂的推荐浓度(1 000 倍)、1/2 倍推荐浓度(2 000 倍)处理不同时间后,共生菌的菌落生长均显著减少,但 2 倍推荐浓度(500 倍)处理下共生菌的菌落数量极显著减少。5%氟虫腈悬浮剂的处理结果与速灭威有相似的趋

势。说明杀虫剂处理对褐飞虱共生菌的生长有极显著的抑制作用。

经过杀虫剂处理后的褐飞虱共生菌,镜检观察发现,与清水对照(图 1a)相比其假菌丝生长不舒展,有所萎缩,上述杀虫剂对菌丝体的影响基本类似。说明化学合成的杀虫剂对共生菌的假菌丝有较大抑制作用(图 1b)。

同样,用植物源杀虫剂 1.2%印楝素乳油不同

浓度(2 倍推荐浓度、推荐浓度、1/2 倍推荐浓度)处理后 2、3、4 d 共生菌的菌落数量均极显著少于对照清水处理,但不同浓度间的差异不显著。说明印楝素对褐飞虱共生菌的生长有极显著的抑制作用,浓度间差异不明显。镜检印楝素处理后类酵母共生菌的假菌丝生长情况,发现与未处理相比,假菌丝有所变形,酵母个体变小、空泡多(图 1c)。说明植物源杀虫剂对共生菌的假菌丝也有一定的抑制作用。

表 1 稻田常用杀虫剂对褐飞虱共生菌生长的影响¹⁾

杀虫剂	药剂稀释倍数/倍	处理后不同时间的菌落数量/个·皿 ⁻¹		
		2 d	3 d	4 d
10%吡虫啉 WP	500	0.00 cB	18.67 dD	63.00 dD
	1 000	0.00 cB	133.33 cC	278.67 cC
	2 000	128.00 bB	848.00 bB	1 072.00 bB
	CK(清水)	1 085.33 aA	1 238.67 aA	1 648.00 aA
48%毒死蜱 EC	500	21.17 bB	50.67 cC	56.00 cC
	1 000	48.83 bB	88.33 bcBC	98.83 cC
	2 000	65.67 bB	159.00 bB	201.67 bB
	CK(清水)	1 722.67 aA	2 314.67 aA	2 476.67 aA
10%溴氰菊酯 EC	500	0.00 cB	0.33 cB	1.33 cB
	1 000	10.33 cB	17.00 bcB	17.33 bcB
	2 000	197.00 bB	238.00 bB	239.00 bB
	CK(清水)	2 842.67 aA	3 050.67 aA	3 117.33 aA
5%氟虫腈 SC	500	2 098.67 bB	2 414.33 bB	2 521.33 bB
	1 000	2 370.67 aA	2 673.33 bAB	2 984.00 bAB
	2 000	2 376.00 aA	2 878.67 aA	3 098.33 abA
	CK(清水)	2 554.67 aA	2 974.67 aA	3 189.67 aA
25%噻嗪酮 WP	500	869.33 dD	1 109.78 cC	1 141.78 cC
	1 000	988.44 cC	1 440.89 bB	1 538.67 bB
	2 000	1 345.78 bB	1 486.67 bB	1 567.56 bB
	CK(清水)	1 450.67 aA	1 683.56 aA	1 729.78 aA
25%速灭威 WP	500	425.78 cB	829.33 cB	872.44 cB
	1 000	740.78 bB	1 229.33 bA	1 324.44 bA
	2 000	1 193.78 bA	1 331.56 bA	1 463.11 aA
	CK(清水)	1 250.67 aA	1 426.67 aA	1 507.56 aA
1.2%印楝素 EC	250	17.00 bB	30.00 cB	46.67 cB
	500	27.67 bB	41.33 bB	55.67 cB
	1 000	43.67 bB	74.67 bB	90.33 bcB
	CK(清水)	232.00 aA	1 457.33 aA	1 490.33 aA

1) 表中数据为 3 次重复的平均值;小写英文字母表示 5%显著水平差异,大写英文字母表示 1%极显著水平差异。

2.2 杀菌剂对类酵母共生菌生长的影响

结果见表 2。可以看出,用井冈霉素、三环唑、百菌清不同浓度(2 倍推荐浓度、推荐浓度、1/2 倍推荐浓度)处理后对褐飞虱类酵母共生菌的菌落生长影响差异大。用井冈霉素的推荐浓度(600 倍)和 1/2 倍推荐浓度(1 200 倍)处理共生菌 2、3 d 后的菌落数量与对照清水处理无显著差异,2 倍推荐浓度

(300 倍)处理的菌落数显著少于对照,但不同浓度处理后 4 d 的菌落数均与对照无明显差异。说明常规浓度井冈霉素对共生菌的生长无抑制作用,但高浓度井冈霉素对共生菌生长的抑制作用明显。

用不同浓度的三环唑处理后 2、3 d,类酵母共生菌的菌落数极显著少于对照清水处理;处理后 4 d,2 倍推荐浓度(300 倍)下的共生菌菌落数显著少于推

荐浓度(600 倍)和 1/2 倍推荐浓度(1 200 倍)的结果,极显著少于对照清水的结果,而 600 倍浓度的处理与 1 200 倍和对照之间的差异显著,后两者的结果差异不明显。说明三环唑对褐飞虱共生菌的菌落生长有较大的抑制作用。

用百菌清的不同浓度处理后,褐飞虱共生菌的菌落数量极显著减少,尤其是推荐浓度(600 倍)、2 倍推荐浓度(300 倍)下的菌落数几乎为 0,而对照的菌落数在 2 000 个以上。这说明,百菌清对褐飞虱共生菌的菌落生长抑制作用非常强烈。

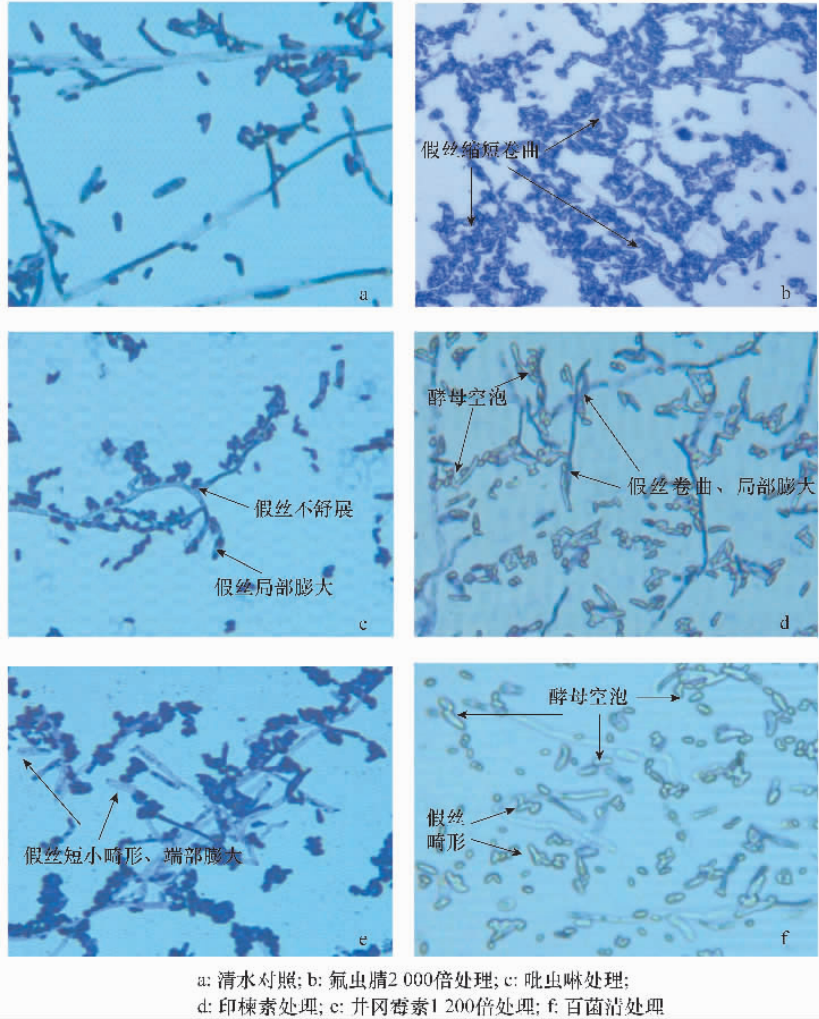


图 1 部分药剂处理对褐飞虱类酵母共生菌菌丝生长的影响

镜检杀菌剂处理后类酵母共生菌的假丝体生长情况发现,经过低于常规浓度的井冈霉素杀菌剂处理的类酵母共生菌,与对照相比,其假菌丝短小畸形、端部膨大,酵母基本上与对照无明显变化(图

1d),其他浓度的井冈霉素及百菌清、三环唑处理后,类酵母共生菌的假丝体膨大短小,酵母多空泡已死亡(图 1e)。说明常规浓度井冈霉素和百菌清、三环唑对共生菌的假菌丝生长影响大。

表 2 稻田常用杀菌剂对褐飞虱类酵母共生菌生长的影响¹⁾

杀菌剂	药剂稀释倍数/倍	处理后不同时间的菌落数量/个·皿 ⁻¹		
		2 d	3 d	4 d
5%井冈霉素 AS	300	1 138.67 bA	1 778.67 bA	2 274.67 aA
	600	1 189.33 abA	1 805.33 abA	2 282.67 aA
	1 200	1 258.67 abA	1 874.67 abA	2 373.33 aA
	CK(清水)	1 328.00 aA	1 920.00 aA	2 568.00 aA

杀菌剂	药剂稀释倍数/倍	处理后不同时间的菌落数量/个·皿 ⁻¹		
		2 d	3 d	4 d
20%三环唑 WP	300	0.33 cB	1.00 cC	98.17 cB
	600	0.33 cB	406.33 bB	479.00 bA
	1 200	45.50 bB	644.00 bB	775.33 abA
	CK(清水)	981.33 aA	1 124.00 aA	1 168.00 aA
75%百菌清 WP	300	0.00 bB	0.00 cC	0.00 cC
	600	0.00 bB	0.00 cC	0.17 cC
	1 200	0.00 bB	3.17 bB	13.17 bB
	CK(清水)	2 060.00 aA	2 133.33 aA	2 228.00 aA

1) 表中数据为 3 次重复的平均值;小写英文字母表示 5%显著水平差异,大写英文字母表示 1%极显著水平差异。

3 讨论

外界逆境因子如温度、外源物质等对褐飞虱体内共生菌数量有明显的影 响,抗生素处理后,褐飞虱雌成虫共生菌比正常的减少了 59.1%~95.2%^[7];高温(35℃)处理初孵若虫 3 d,也获得共生菌明显减少的褐飞虱^[2,8];有机磷类杀虫剂(甲胺磷、氧化乐果)处理后显著影响褐飞虱体内共生菌的数量^[6]。本文试验结果表明,不同杀虫剂对褐飞虱共生菌的生长有显著的抑制作用;杀菌剂如井冈霉素对褐飞虱共生菌的生长抑制作用不明显,三环唑、百菌清对褐飞虱共生菌的菌落和菌丝体生长有强的抑制作用。

在稻田,长期频繁施用的杀虫剂、杀菌剂是害虫生长发育过程中遭遇到的最重要的外界逆境条件。在“生与死”面前,共生菌在害虫对杀虫剂产生抗药性的过程中是否起到作用呢?本文研究明确了稻田常用的不同类型杀虫剂如烟碱类杀虫剂(吡虫啉)、有机磷类(毒死蜱)、菊酯类(溴氰菊酯)、苯基吡唑类(氟虫腴)、昆虫生长调节剂(噻嗪酮)、氨基甲酸酯类(速灭威)以及部分杀菌剂对褐飞虱类酵母共生菌的生长影响显著。程新胜等研究认为,离体状态的烟草甲共生菌对培养基中结合态烟碱有一定的分解作用^[9],结合本课题组以前有关使用杀虫剂后共生菌数量减少的研究结果,可能说明这样一个问题:褐飞虱对杀虫剂产生抗药性的原因之一可能是由于类酵母共生菌对药剂的抗药性增强,或参与杀虫剂的分解,使褐飞虱克服杀虫剂逆境的胁迫,产生抗药性,使杀虫剂的防治效果显著下降。至于杀虫剂对褐飞虱类酵母共生菌的解毒酶活性影响、共生菌降解农药的能力等内容正在深入研究。

参考文献

- [1] 中国农业技术推广服务中心药械处. 关于中晚稻褐飞虱对吡虫啉抗药性情况的通报[EB/OL]. [2005-9-28]. <http://www.asng.gov.cn/Artice-Show>.
- [2] Chen C C, Cheng L L, Kuan C C, et al. Studies on the intracellular yeast-like symbiote in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål. II. Effects of antibiotics and elevated temperature on the symbiote[J]. Z Ang Ent, 1981, 92: 440-449.
- [3] Wilkinson T L, Adams D, Minto L B, et al. The impact of host on the abundance and function of symbiotic bacteria in an aphid[J]. J of Exp Biology, 2001, 204, 3027-3038.
- [4] Noda H. Histological and histochemical observation intracellular yeast-like symbiotes in the fat body of the smaller brown planthopper, *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae) [J]. Applied Entomology and Zoology, 1977, 12: 134-141
- [5] Cheng D J, Hou R F. Histological observation on transovarial transmission of a yeast-like symbiote in *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae)[J]. Tissue and Cell, 2001, 33 (3): 273-279.
- [6] 徐红星, 郑许松, 童中华, 等. 杀虫剂对褐飞虱体内共生菌的影响[J]. 浙江农业学报, 2000, 12(3): 126-128.
- [7] Nagata T, Kamimum T, Wang Y C, et al. Recent status of insecticide resistance of long-distance migrating rice planthoppers monitored in Japan, China and Malaysia[C]// Inter-country Forecasting System and Management for Brown Planthopper in East Asia. 2001: 169-177.
- [8] Raguraman S, Jayarai S. Effect of neem on yeast-like symbionts harbored by brown planthopper[J]. IRRN, 1988, 13(5): 32-33.
- [9] 程新胜, 薛宝燕, 魏重生. 烟草甲体内类酵母共生菌与烟碱的互作效应研究[EB/OL]. (2004). <http://www.tobacco.org.cn/news/zt/2004nh/nhlw/ny/28.htm>.
- [10] 薛宝燕. 食料与共生菌对烟草甲的影响及烟草甲防治技术研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2005.
- [11] 张玲. 微生物学实验指导[M]. 北京: 北京交通大学出版社, 2007: 23-24, 54-56.