

杨尺蠖核型多角体病毒理化特性研究 及其在病毒杀虫剂研制中的应用*

于在林

(中国林业科学研究院林业研究所)

摘要 本文系统地综述了作者对杨尺蠖核型多角体病毒AciNPV进行理化特性研究和将其应用于AciNPV杀虫剂研制中的结果。通过对AciNPV进行分离提纯,血清学特性,蛋白质结构组成和病毒基因组研究,获得了大量的理化特性详细资料。文中还就昆虫病毒的同源性关系,感染病毒后的早期检测,以及对在我国发展昆虫病毒杀虫剂需要解决的问题,提出了理论依据和实用有效的检测技术等。

关键词 杨尺蠖;核型多角体病毒;病毒杀虫剂

杨尺蠖(*Apocheima cinerarius*)广泛分布于我国北方十余个省区。是“三北”防护林及用材林的主要害虫之一。年发生面积达600多万亩,常爆发成灾,严重危害后可造成树木成片死亡。每年大量使用农药,不仅使杨尺蠖产生了抗药性,而且严重污染了环境,破坏了生态平衡。为从根本上解决这一问题,对由河北省坝上地区分离到的杨尺蠖核型多角体病毒(以下简称AciNPV)进行了应用研究^[1]。AciNPV在病毒分类中属杆状病毒科A亚组。对AciNPV的理化特性研究在国内外尚未见报道。现系统地综合报道1982—1987年对AciNPV的分离纯化,血清学特性,蛋白质和基因组特性的研究结果^[2-6],并着重于将这些特性应用于生产防治,解决理论上和应用中的实际问题。作者首先应用了限制性内切酶分析技术,使AciNPV杀虫剂在全国9省市推广应用9万余亩,取得了1466万元的经济效益和明显的社会生态效益。本文还报道了对25株昆虫病毒快速鉴别方法,以及限制性内切酶分析,分子杂交和血清学技术用于病毒间同源性检测的结果。

一、材料与方 法

(一) 毒株及试验来源

本研究以AciNPV为主体。同时与24株森林害虫病毒分离株的理化特性进行比较和同源性测定。病毒名称及来源参见表1。生物试剂、DNA和蛋白质的标准分子量为进口试剂,部分内切酶为中国科学院生产,SDS为本室重结晶,化学试剂均为分析纯。

(二) AciNPV 理化特性研究

1. 多角体、病毒粒子及核衣壳的纯化 AciNPV属包涵体病毒,纯化采用作者建立的方法^[2]。病毒粒子从纯化的多角体中分离,核衣壳则从纯化的病毒粒子中分离获得^[2,7]。

2. 多角体N-P蛋白及A、B蛋白分离 多角体蛋白按两种方法制备:硫酸铵盐析法^[8],

本文于1988年11月1日收到。

* 王贵成、吴燕等参加部分工作。

表 1 用于同源性比较的林业昆虫病毒^①

序 号	宿 主	病 毒	分 离 地	简 称
1	美国白蛾 (<i>Hyphantria cunea</i>)	MNPV	辽 宁	HcNPV
2、3、4	杨尺蠖 (<i>Apocheima cinerarius</i>)	SNPV	河北、新疆、交叉感染 (内蒙)	AciNPV
5、6	枣尺蠖 (<i>Sucra jujuba</i>)	SNPV	山东、交叉感染(天津)	SjNPV
7、8	木樨尺蠖 (<i>Culcula panteraius</i>)	SNPV	山东、河南	CpNPV
9	油松毛虫 (<i>Dendrolimus tabulaeformis</i>)	CPV	北 京	DtcPV
10	马尾松毛虫 (<i>Dendrolimus punctatus</i>)	CPV	浙 江	DpCPV
11	扁刺蛾 (<i>Thosea sinensis</i>)	MNPV	北 京	TsNPV
12	褐边绿刺蛾 (<i>Thosea baibarance</i>)	MNPV	北 京	TbNPV
13、14 } 15 }	双齿绿刺蛾 (<i>Latoia hilarat</i>)	MNPV	北京、交叉感染(北京)	LhNPV
16、17	杨毒蛾 (<i>Leucoma salicis</i>)	MNPV	北京、交叉感染(北京)	LsNPV
18 } 19 } 20 }	柳毒蛾 (<i>Leucoma candida</i>)	MNPV + CPV MNPV MNPV	北 京 交叉感染(北京) 新 疆	LcNPV
21 } 22 }	舞毒蛾 (<i>Lymantria dispar</i>)	MNPV CPV	北 京 北 京	LdNPV LdCPV
23 } 24 }	杨扇舟蛾 (<i>Melalopha anachoreta</i>)	GV GV	北 京 交叉感染(北京)	MaaGV
25	分月扇舟蛾 (<i>Melalopha anastomosis</i>)	GV	贵 州	MaGV

① 部分病毒由严静君、何介田、陈昌洁、王贵成、张兆义、袁长林惠赠。

分离获得的多角体蛋白为N-P蛋白，等电点分离法^[9]，从多角体中分离A、B蛋白。如先将AciNPV 70℃水溶30min，再行分离制备的多角体蛋白，分别为灭活酶N-P蛋白和A、B蛋白。

3. DNA的分离纯化 采用SDS-苯酚法分离DNA^[9]。

4. 柱层析和超离心沉降系数测定 对经不同方法分离的病毒粒子和核衣壳、DNA及多角体N-P、A、B蛋白等分别用sepharose 2B和6B装柱进一步纯化或分析其柱层析行为。对溶于蒸馏水中的病毒粒子，分别溶于TE和1×SSC中的DNA，以及溶于微碱蒸馏水中的A、B蛋白，在日立分析型超离心机上分析它们的沉降系数(S_{20w})。DNA应用紫外吸收光学系统记录溶液的微分和积分变化曲线。其余用可见光系统。

5. DNA含量、DNA热溶曲线以及多角体蛋白的氨基酸组成分析 用二苯胺改良法测定多角体中DNA的含量，RNA存在与否，用地衣酚显色法进行。纯化的DNA溶于0.1×SSC中，在美国PERKIN-ELMER LAMBDA 7紫外分光光度计上测定其热溶曲线，并计算其(G+C)%含量及增色效应。用氨基酸自动分析仪测定病害各组合中氨基酸组成及含量(%)。

6. AciNPV的抗血清制备及免疫学分析 分别制备了AciNPV各组分的免抗血清，免疫总量和效价分别为：①多角体碱解液180mg，效价1:1600；②多角体蛋白200mg，效价1:1600；③病毒粒子170mg，效价1:3200。检测用抗血清做1:4稀释。免疫学分析方法为琼脂糖双扩散，胶内吸收实验，微量免疫电泳和对流免疫电泳。

7. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)及琼脂糖凝胶电泳分析 蛋白质分析采用连续和不连续系统的SDS-PAGE垂直板状电泳装置分析，DNA采用0.6—1%琼脂糖凝胶平板电泳分析。

8. 电镜观察 采用本实验室常规方法进行^[2,8,10]。

9. DNA限制性内切酶分析 DNA溶于酶反应液中, 加入5—10 μ 酶解2.5 h, 65 $^{\circ}$ C, 5 min灭活酶后冰浴至电泳。双酶切则是先用一种酶反应后, 加热灭活酶, 再加入第二种酶作用。以 λ -DNA做平行酶切。

(三) 病毒理化特性在病毒杀虫剂研制中的应用

1. 对13株昆虫病毒及交叉感染后的有检昆虫的血清学技术监测 13株林业昆虫病毒见表1及参考文献[3]。家蚕、蜜蜂取食AciNPV后, 取幼虫组织抽提液为待检抗原。

2. 对3龄幼虫感染AciNPV后的早期检测 以每毫升 2.5×10^8 多角体(林间防治使用浓度)感染杨尺蠖3龄幼虫, 12 h后开始取样, 随后每隔12 h取样一次, 每次20头, 幼虫加10—20 μ l碱解液研磨后直接检测。

3. 25株昆虫包涵体病毒的SDS-PAGE多肽图谱比较 为快速鉴别昆虫病毒为目的, 选用比较不同包涵体病毒的结构多肽SDS-PAGE图谱方法(制样方法另文报道)。

4. 限制性内切酶分析及DNA分子杂交技术用于病毒的同源性鉴别 AciNPV交叉感染枣尺蠖后, 从中分离出一株NPV, 这株NPV与AciNPV之间的关系如何? 用限制性内切酶分析两者的酶切图谱, 比较两者的同源性。采用DNA-DNA分子杂交技术, 用缺口平移法, 分别制作了美国白蛾NPV和AciNPV-DNA的分子探针, 测定两者之间的同源性。

5. 对AciNPV杀虫剂在连续传递复制中遗传变异的检测 从1981—1985年连续用限制性内切酶对AciNPV的基因组进行分析。1981—1982年为-20 $^{\circ}$ C保存材料, 1983年起每年进行同步检测。

二、结 果

(一) AciNPV理化特性研究

1. AciNPV各组分的分离提纯 为AciNPV建立的包涵体病毒提纯方法十分有效, 已扩大应用于其它类型的包涵体纯化^[2]。分离的多角体N-P蛋白和A、B蛋白、DNA、病毒粒子、核衣壳和多角体碱解液均应用柱层析进行再次纯化及特性分析。纯化的病毒粒子、核衣壳和DNA的sepharose 2B柱层析均为单一洗脱峰并且典型的紫外吸收光谱^[2,6]。多角体N-P蛋白和A、B蛋白经过sepharose 6B柱层析后, 表现不同。N-P蛋白为3个峰, A、B蛋白为1个峰, A+B蛋白合并洗脱为2个峰, 且B蛋白在前峰, A蛋白在后峰^[4]。

超离心沉降分析表明: 病毒粒子 $S_{20w} = 705$; A、B蛋白 S_{20w} 分别为4.9和8.9; DNA $S_{20w} = 13.7$, 浓度变化范围均不大^[2,4,6]。

2. DNA含量、DNA热溶曲线以及蛋白质氨基酸组成分析 经二苯胺显色法测定AciNPV多角体中DNA含量为6 μ g/mg。不含RNA。溶于 $0.1 \times$ SCC中的AciNPV-DNA呈典型的双链核酸热溶曲线^[9]。DNA的 T_m 值约为70.2 $^{\circ}$ C; A_{260} 下的增色效应约为36%。根据Mandel等公式^[11]计算 $(G+C)\% = (T_m - 53.9) \times 244$, 则AciNPV-DNA的 $(G+C)\% = 39.8\%$, 与其它昆虫杆状病毒DNA的GC比相近。

对完整多角体和A蛋白的氨基酸组成测定表明AciNPV中富含天门冬氨酸、谷氨酸。完整多角体中富含酪氨酸, 而A蛋白中则富含亮氨酸。测定中还注意到两者的氨酸均为痕量, 而完全不含脱氨酸^[2,4]。

3. AciNPV抗血清制备及免疫学分析 所制备的三种抗血清, 多角体碱解液, 多角体

蛋白和病毒粒子抗血清效价较高,均不与健康幼虫虫体蛋白及血淋巴有免疫学反应。表明抗血清可直接用于病毒的检测。但三种抗血与各抗原之间均有交叉反应。经胶内吸收实验证明,病毒粒子和多角体蛋白之间具有不同的抗原决定簇。微量免疫电泳证明,病毒粒子抗血清与多角体碱解液可形成三条沉淀带。与多角体蛋白形成一条沉淀带。新鲜制备的病毒粒子不能泳动入凝胶内,在原点与抗血清形成沉淀环^[3]。

以N-P蛋白抗血清与A、B蛋白和N-P蛋白做免疫双扩散实验,表明A、B蛋白仅与N-P蛋白抗血清形成一条沉淀带,且两者溶合。观察可见A蛋白扩散近抗血清孔(表明分子量小,扩散快),B蛋白则靠近抗原孔(扩散慢,分子大)^[4]。

4. AciNPV-DNA 电镜观察和内切酶分析 AciNPV核衣壳经低浓度尿素处理后,用细胞色素C展层后,可见核衣壳膨胀近一倍,从一端释放出核酸来,也有从核衣壳中间释放DNA的现象^[6]。纯化的DNA充分展层后,看到环状和线状分子。环状DNA分子周长约27.38 μm 。根据此按公式 $M = 1.97L$ 计算AciNPV-DNA分子量约为 53.94×10^6 dal。

选用7种限制性内切酶Pst I、Pvu II、Sal I、EcoR I、Bgl II、Xho I、Bgl II分别酶切DNA产生4、6、22、20、11、5、7个片段数。Bgl II和EcoR I双酶解得到DNA片段为26个。在某些单酶解图谱中出现了“亚分子片段”^[6]。对EcoR I酶切DNA的各片段的分子量进行积加,总分子量为 56.55×10^6 dal。相当于85.70Kbp,这一结果与电镜观察一致。

5. AciNPV蛋白质特性 对AciNPV各组分的结构多肽SDS-PAGE分析表明,连续和不连续系统的SDS-PAGE所得结果一致。A、B蛋白和N-P蛋白多肽图谱一致。N-P蛋白经柱层析纯化后为一条主带(3.2×10^4 dal)。多角体蛋白共有6个结构多肽,病毒粒子和核衣壳则分别有19和7个结构多肽,它们的分子量及SDS-PAGE图谱见参考文献[4]。

70 $^{\circ}\text{C}$ 灭活酶后分离得到的多角体蛋白,多了一个 7.00×10^4 dal的肽段,而少了一个 1.25×10^4 的多肽。这表明AciNPV有碱性蛋白酶活性存在,对这种酶的研究、开发利用需要做进一步工作。

(二) 病毒理化特性在病毒杀虫剂研制中的应用

1. AciNPV与13株昆虫病毒分离株间的血清学关系 测定了13株林业昆虫病毒与AciNPV之间的血清学关系,结果表明:三株CPV和两株GV都不与AciNPV抗血清起免疫学反应,表明它们之间无血清学关系。但不同的NPV与AciNPV之间的关系较为复杂。舞毒蛾NPV、英国白蛾NPV、双齿绿刺蛾NPV与AciNPV无交叉反应。而木榨尺蠖NPV(河南株和山东株)、枣尺蠖NPV(山东株和天津株)及杨毒蛾NPV与AciNPV抗血清有交叉反应,均形成一条沉淀带。这些NPV在形态上似乎与AciNPV略有差异(待发表),但从沉淀效价上它们可与AciNPV相区别^[3]。

2. 杨尺蠖3龄幼虫感染AciNPV的早期检测 为进行病毒的形成机理、环境监测及林间病毒流行病学调查等项研究做准备,进行的早期检测研究表明,AciNPV的最早检出时间在36h^[3]。

3. 25株昆虫包涵体病毒的SDS-PAGE多肽图谱比较 首先分析了16株昆虫病毒(3株CPV、3株GV和10株NPV)以及不同地分离株和交叉感染后获得的9株病毒的SDS-PAGE多肽图谱,比较结果清楚¹⁾。采用我们的制样程序,可从蛋白质结构多肽角度为每种病毒建

1) 于在林,1988,25株昆虫病毒SDS-PAGE多肽图谱比较(待发表)。

立一种标准多肽电泳图谱。将其贮存于计算机中与未知样名的图谱比较来确定同源性。本文仅讨论用这种方法区别AciNPV交叉感染非靶昆虫后所分离的病毒同源性比较。AciNPV感染杨扇舟蛾后,幼虫死于GV。SDS-PAGE分析表明这株GV与原病毒株 杨扇舟蛾GV一致,而与AciNPV的不同。AciNPV感染枣尺蠖后分离的NPV其图谱与AciNPV不同,而与枣尺蠖NPV山东株无明显差异。这一结果得到内切酶分析证明。木撩尺蠖 NPV 山东株与河南株无差异。同一科昆虫不同种,得到的SDS-PAGE图谱也不同,但在主要多肽分布上有些特点可以寻找出来。详细分析将另文报道。采用铬银染色技术,更大幅度地提高了灵敏度,使样品用量更少。一滴样品即可进行SDS-PAGE分析,设备简单,因此这一方法极具推广价值。

4. 限制性内切酶分析及DNA分子杂交技术用于病毒的鉴别 AciNPV攻毒枣尺蠖后,由感病枣尺蠖虫体内分离获得一株NPV,在形态上与AciNPV略有不同。在SDS-PAGE多肽图谱上主带相似,次带略有不同。进一步分离DNA,应用限制性内切酶 Bgl II 酶切后,在琼脂糖凝胶电泳图谱上明显可见两者的差异。片段数目相同而各片段迁移率不同^[6]。由此肯定其与AciNPV不同源。

对美国白蛾 NPV与 AciNPV 之间的同源性测定,除了血清学技术,蛋白质多肽比较,限制性内切酶分析DNA外,还采用了更为高级和灵敏的技术。分别应用缺口平移法制备AciNPV-DNA分子探针和美国白蛾 NPV-DNA 分子探针²⁾。经分子杂交试验表明各 DNA 分子探针仅与同源DNA杂交。从而证实了限制性内切酶电泳图谱的不同是其同源性的不同。

5. 对 AciNPV 杀虫剂在连续传递复制中,遗传变异的控制技术 从1981—1985年,连续将AciNPV用于林区生产性防治杨尺蠖,同时回收病毒死虫制成杀虫剂用于次年的防治,由此产生了明显的经济效益。然而病毒是否会在连续传递复制中发生变异?如何检测?也就成了能否使用这种方法生产病毒杀虫剂的关键,因为发生变异后就会影响到病毒的杀虫毒力、宿主范围、安全性等重大因素。我们建立了从病毒基因组的限制性内切酶图谱上比较,来检测可能发生的变异。连续5a应用EcoR I酶切电泳比较结果表明,未见明显改变。从而决定了可以回收生产性防治后的病死虫加工生产病毒制剂。

三、讨 论

昆虫病毒尤其是杆状病毒(NPV和GV)在害虫的生物防治中起着重要的作用。从最新统计资料来看,全世界至少已从1200余种昆虫、蜚蠊类中发现有1800余种病毒病³⁾。有许多病毒在理论上和实践中都有可能被开发为病毒杀虫剂。可实际发展到制剂水平的病毒寥寥无几。这固然是受多种因素制约,但主要是缺乏病毒制剂注册登记所需的完整评价程序,在我国尤其如此。

作者设想^[5]就我国实际情况出发,建立一套完整可行的注册登记指标,以此使病毒杀虫剂的开发得以遵循,这是首要的任务和前提条件。作者提出这些指标可归纳为三大项:病毒的鉴别指标;病毒的安全性试验指标以及病毒制剂质量检测指标。在本文仅结合AciNPV理化特性探讨第一项指标,其它见作者另文^[5]。

2) 于在林, 1988, 美国白蛾NPV与杨尺蠖NPV的DNA分子杂交研究(待发表)。

3) 于在林、蔡秀玉, 1988, 昆虫病毒病名录, 中国林业出版社(印刷中)。

对 AciNPV 各组分理化特性研究的结果已分别在各篇论文中详细讨论^[1-6]。在此重点讨论 AciNPV 杀虫剂研制中是如何应用这些特性的。同时阐明建立病毒的鉴别指标,即选择病毒本身的特性,建立不同的鉴别技术和方法,以保证在病毒杀虫剂的研制和野外防治试验中病毒同源性的一致。AciNPV 杀虫剂建立的鉴别指标有如下几点:

1. 固定纯化多角体(包涵体)的程序 采用固定的(标准的)纯化程序是比较的前提。为此针对包涵体病毒建立了一个尿素、SDS 和 NaCl 分别处理多角体的程序。用该法提纯的病毒制备抗血清,经免疫学技术试验,抗血清不与健康幼虫组织蛋白有血清学反应。表明该程序的可靠性,并且这种方法同样适用于 GV 和 CPV。

2. 完整多角体的氨基酸组成分析 有了固定程序提纯多角体,就可直接进行氨基酸组成分析。由于有一致的提纯方法,且制样简便、仪器操作,因而重复性高。包涵体蛋白分离纯化手续较繁,不易操作规范化,纯度缺乏标准。应取代目前国内外常进行的分离纯化包涵体蛋白而后分析氨基酸用作比较。

3. 制备标准抗血清 血清学技术用于病毒的同源性检测十分可靠和简便。本试验以制备的 AciNPV 各组分抗血清为标准,观察了与 13 株昆虫病毒之间的血清学关系,以及对 AciNPV 交叉感染的有益昆虫(家蚕和蜜蜂)进行了血清学检测。有了标准抗血清,利用免疫技术就可对病毒的应用、野外流行病学调查、病毒的同源性进行检测。

4. 病毒的 SDS-PAGE 分析病毒的结构多肽图谱 病毒的结构多肽是病毒基因组的表达产物,在病毒的鉴定中具有重要的表型特征(Harrap, 1977)^[12]。对病毒各组分分离提纯后,就可进行电泳,了解各组分的结构多肽组成,从而得到各具特征的多肽图谱。以快速区别鉴定为目的,我们建立了一种快速制样的方法,可直接对完整病毒进行结构多肽组成分析。采用铬银染色法可大幅度提高灵敏度,使样品所需量降至最低程度。用这种方法对 25 株昆虫病毒(NPV、CPV、GV)进行分析,结果重复性高,区别效果明显。

5. 病毒基因组特性分析 应用限制性内切酶分析技术,使杆状病毒的分析简便易行。我们为 AciNPV 建立了七种单、双酶解图谱,并以此为依据,在杀虫剂研制中建立了一种病毒同源性检测技术。这种技术做为基因突变的检测指标是可靠的。1981—1985 年对林间防治后回收的病毒,进行遗传变异检测,结果表明,连续传递复制的 AciNPV 内切酶图谱无明显差异。这一应用技术已经受到生产部门的好评。还以此判别了 AciNPV 交叉感染枣尺蠖后,所分离的 NPV 与 AciNPV 之间的关系,两者的 Bgl II 酶切图谱,很易将它们相区别。采用 DNA 分子杂交技术测定美国白蛾 NPV 与 AciNPV 无同源性,也验证了内切酶图谱的不同,同源性就不同。

以上基本指标是每一种病毒杀虫剂在用于野外防治前都应了解的,它们为病毒的应用提供重要的依据。

参 考 文 献

- [1] 中国林科院林研所等(王贵成、于在林执笔), 1987, 杨尺蠖核型多角体病毒应用的研究, 林业科技通讯, (3): 4—7。
- [2] 于在林等, 1987, 杨尺蠖核型多角体病毒的提纯及某些理化性质的分析, 林业科学, 23(2): 221—226。
- [3] 于在林等, 1987, 杨尺蠖核型多角体病毒血清学特性研究, 杀虫微生物, 1: 132—139。
- [4] 于在林等, 1987, 杨尺蠖核型多角体病毒蛋白质的特性, 病毒学报, 3(4): 343—349。

- [5] 于在林, 1987, 昆虫病毒制剂质量检测指标初探, 林业科技通讯, (10):15—18.
- [6] 于在林等, 1986, 杨尺蠖核型多角体病毒DNA特性, 病毒学报, 2(4):344—350.
- [7] Summers, M. D. et al., 1970, Alkali-liberated granulosis virus of *Trichoplusia ni*, I. Density gradient purification of virus components and some of their in vitro chemical and physical properties, J. Invertebr. Pathol., 16:227—240.
- [8] Bell, C. D. et al., 1977, Serological studies on virions and polyhedron protein of a nuclear polyhedrosis virus of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, virology, 78: 162—172.
- [9] Longworth, J. F., 1972, The purification of properties of inclusion body protein of the granulosis virus of *Pieris brassicae*, J. Invertebr. Pathol., 19: 42—53.
- [10] 王学兰等, 1983, 几种昆虫病毒粒子核酸释放的电子显微镜观察, 科学通报, 24:1524—1526.
- [11] Mandel, M. et al., 1968, Use of ultraviolet absorbance temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA, In: L. Grossman and K. Moldave (ed.), Methods in Enzymology, 12, 195—206, Academic press Inc., New York.
- [12] Harrap, K. A. et al., 1979, The structural properties and identification of insect viruses, Adv. Virus Res., 25, 273—355.

STUDIES ON BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL CHARACTERISTICS OF A NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS OF *APOCHEIMA CINERARIUS* AND THE USE IN THE RESEARCH OF VIRAL INSECTICIDES

Yu Zailin

(The Research Institute of Forestry CAF)

Abstract In this paper, the studies on biochemical and biophysical characteristics of a nuclear polyhedrosis virus of *Apocheima cinerarius* and its use in the research of viral insecticides were reviewed comprehensively. The characteristics of virus included its purification, serology, structural proteins and genome. The homologous relationship of insect viruses, the earliest detection of viral infection and the development of viral insecticide in China were also discussed in detail.

Key words *Apocheima cinerarius*; AcNPV; viral insecticide