

科云牌棉铃虫核型多角体病毒生物农药的规模化生产和应用

秦启联¹ 程清泉² 郑建峰² 陈新中² 张松涛² 李瑄¹ 苗麟¹ 张寰¹¹ 中国科学院动物研究所, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100080;² 河南省济源白云实业有限公司, 中国科学院动物研究所生物农药中试基地, 济源 454652)

摘要: 昆虫病毒生物农药是纯天然无公害生物农药产品, 本文介绍了中国科学院动物研究所同河南省济源白云实业有限公司合作, 成功开发并商业化棉铃虫病毒生物农药的基本情况。我们开发的棉铃虫病毒生物农药注册商标“科云牌”, 包括两个产品: 科云牌 5 000 亿 PIB/g 棉铃虫病毒原粉和科云牌 600 亿 PIB/g 棉铃虫病毒水分散粒剂。原粉产品已出口到欧洲, 制剂产品用于棉铃虫防治, 2006 至 2007 年在棉田累计推广应用 10 万 hm² 次。

关键词: 棉铃虫核型多角体病毒 科云 生物农药 应用 水分散粒剂

Production and Application of *Helicoverpa armigera* Nucleopolyhedrovirus Bio-pesticides Trademarked KEYUN on Large Scale

Qin Qilian¹ Cheng Qingquan² Zheng Jianfeng² Chen Xinzhong²
Zhang Songtao² Li Xuan¹ Miao Lin¹ Zhang Huan¹¹ State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080;² Pilot-Scale Base of Bio-Pesticides, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Henan Jiyuan Baiyun Industry Co., Ltd., Jiyuan 454652)

Abstract: Baculoviral bio-pesticides are processed from baculoviruses which specialized to kill insect pests while no harm to the environment and human beings. Based on the cooperation between Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences and Henan Jiyuan Baiyun Industry Co., Ltd., *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus bio-pesticides (HaNPV) was developed and commercialized successfully. The products of HaNPV, trademarked KEYUN, include KEYUN 500 billion PIB/g HaNPV raw powder and KEYUN 60 billion PIB/g HaNPV water dispersible granule (WDG). The raw powder product had exported to a company in Europe and

杆状病毒科 (Baculoviridae) 包含两个属, 核型多角体病毒 (nucleopolyhedrovirus, NPV) 和颗粒体病毒 (granulovirus, GV), 宿主主要是昆虫, 也包括其它一些节肢动物。由于杆状病毒的病毒粒子包被在非常稳定的包涵体蛋白中, 在环境中非常稳定, 同时对宿主昆虫具有较强的侵染力和毒力, 因而非常适于生产加工成病毒生物农药, 用于害虫的生物防治 (Fuxa, 1993; Moscardi, 1999)。病毒生物农药完全

来源于自然, 对宿主昆虫专一性强, 对其他生物和环境无任何毒副作用, 属绿色、环境友好型农药产品。早在上世纪 40 年代, Balch 等 (1944) 就报道了欧洲云杉叶蜂 (*Gilpinia hercyniae*) 种群被杆状病毒有效控制的情况, 病毒病在害虫种群中流行, 致使随后的 50 余年都不需要进行防治。

2003 年开始, 中国科学院动物研究所同河南省济源白云实业有限公司合作, 成立了动物所生物农

基金项目: 本项目得到国家科技支撑计划课题 (2006BAD08A1202) 资助

作者简介: 秦启联 (1967-), 男, 副研究员, 从事昆虫病毒生物农药产业化开发

药中试基地,开发生产多种杆状病毒生物杀虫剂,其中棉铃虫核型多角体病毒杀虫剂的生产 and 应用在中试基地中最先获得成功,生产并登记了高含量的病毒原粉(5 000 亿 PIB/g HaNPV 原粉)和超低用量的水分散粒剂新剂型(600 亿 PIB/g HaNPV 水分散粒剂)。对棉铃虫病毒产品的生产和应用情况作简要介绍。

1 材料与方法

1.1 病毒毒株

棉铃虫核型多角体病毒 (*Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus, HaNPV) 毒株来源于中国科学院动物研究所昆虫病毒学研究所,经接种 4 龄初期棉铃虫幼虫,扩增后分离纯化获得。规模化生产所用的病毒在河南省济源白云实业有限公司病毒毒株保藏车间,用 4 龄初棉铃虫扩增,分离纯化后用于规模生产的病毒接种。

1.2 HaNPV 限制性内切酶图谱

为便于对规模化生产的 HaNPV 毒株进行定性,用限制性内切酶对其进行酶切分析。纯化的 HaNPV 多角体加入病毒碱解液(0.1 M Na₂CO₃ 和 0.15 M NaCl),室温下碱解 30min,10 000g 离心 10min,上清中加入 1/10 体积的 1 M Tris. HCl(pH 8.0),用蛋白酶 K(终浓度是 50mg/ml,含有 0.005 M EDTA,0.5% SDS,0.01 M Tris. HCl,pH = 7.8)在 56℃ 下消化 2h。用苯酚抽提法提取 HaNPV 基因组 DNA,分别用限制性内切酶 *EcoR* I, *Xho* I, *Pst* I, *BamH* I, *Hind* III 消化病毒 DNA,0.8% 的琼脂糖凝胶电泳获得内切酶图谱。

1.3 病毒规模生产

将分离纯化的 HaNPV 用蒸馏水配制成 2×10^7 PIB/ml 的悬浮液,均匀喷拌在切成小块(大小约 0.7 × 0.7 × 0.7cm)的棉铃虫人工饲料上,每 1 000g 饲料拌入 20ml 左右的病毒悬液。稍稍晾干饲料表面,然后分装到扩增病毒的方格盒中(大小为 25 × 25 × 5cm),每盒放入约 150g 饲料,同时接入 4 龄初期的棉铃虫幼虫 100 头。将接入棉铃虫的方格盒码放在 27℃、无光照的病毒扩增车间,病毒将随着幼虫的取食侵染虫体,得到扩增。

4d 后收集病死的棉铃虫尸,加入 4 倍量的蒸馏水,经研磨、过滤、差速离心纯化病毒获得病毒原浆。

将病毒原浆真空冷冻干燥,气流粉碎,获得 HaNPV 原粉。

1.4 制剂加工

根据原粉中病毒的含量,添加适量的载体、分散剂、润湿剂、崩解剂、光保护剂、粘结剂等农药助剂,经气流粉碎机粉碎、混合机混合、流动床造粒、真空干燥、过筛等步骤,获得 HaNPV 水分散粒剂产品。流程图如下(图 1)。

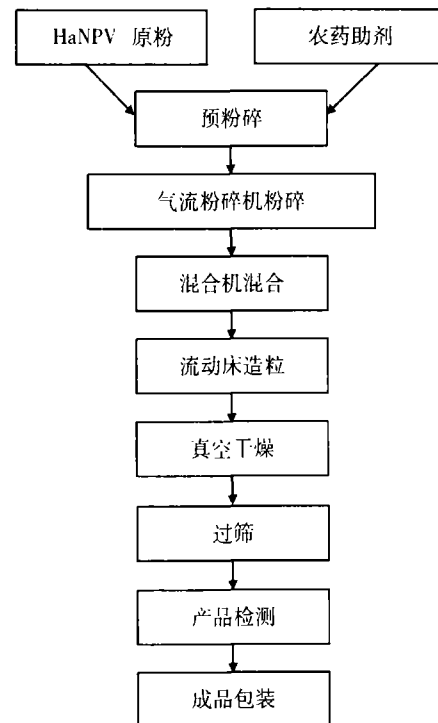


图 1 棉铃虫核型多角体病毒(HaNPV)水分散粒剂生产流程

2 结果与分析

2.1 限制性内切酶图谱(图 2)

杆状病毒基因组限制性内切酶图谱可以用来进行种类的鉴定,同时也是病毒的基本特征。对规模生产的病毒毒株进行内切酶谱分析,不仅可以作为毒株的基础资料,而且便于同其它病毒或毒株区别,是杆状病毒生物杀虫剂产业化不可或缺的内容。

2.2 科云牌 5 000 亿 PIB/g HaNPV 原粉

按企业目前的生产规模,每天有 50 ~ 100 万头 4 龄初期的健康棉铃虫幼虫持续提供给病毒接种车间进行病毒扩增。约 70% 的幼虫在接种 4 ~ 6d 后感染病毒而死亡,其余的 30% 幼虫在早期死亡或后

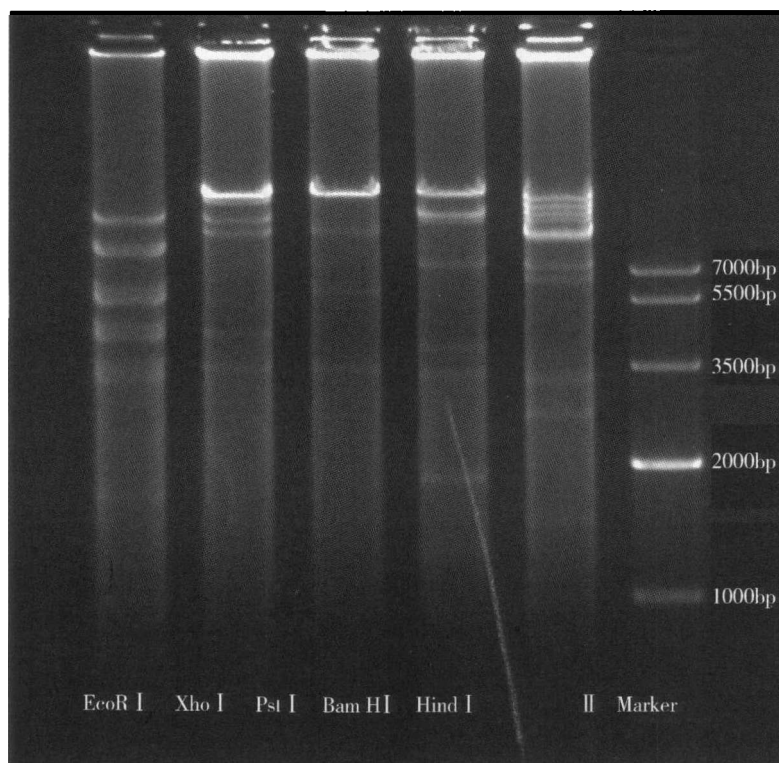


图2 棉铃虫核型多角体病毒(HaNPV)限制性酶切图谱

期化蛹,因而病毒接种的效率约70%。这样,病毒的日生产量约为 $1 \sim 2 \times 10^{15}$ PIB,按每亩次田间病毒使用量为 1×10^{11} PIB计算,每天生产量达到0.77~1万 hm^2 次。

冷冻干燥的病毒原粉,经气流粉碎后计数,根据各生产批次病毒原粉多角体的实际含量,加入适量的表面活性剂,将之调配成含量为5000亿 PIB/g的原粉,按企业标准检测合格后即为5000亿 PIB/g的棉铃虫核型多角体病毒原粉产品。该产品是灰白色粉状物,注册商标“科云牌”,农药临时登记证号:LS20042102。

依据产品的企业标准(Q/HJB 001-2004),合格的科云牌5000亿 PIB/g HaNPV原粉需要达到如下的控制指标:多角体含量 ≥ 5000 亿 PIB/g;水分 $\leq 1.5\%$;pH范围是7.0~8.0;细度(通过45mm标准筛) $\geq 95.0\%$ 。

2.3 科云牌600亿 PIB/g HaNPV水分散粒剂

水分散粒剂(WDG)是20世纪80年代初发展起来的一种农药新剂型,也称干悬剂。因具有对环境友好、加工过程基本无粉尘、有效成分含量高、田

间用量少、在水中崩解迅速等优点,成为当前农药剂型发展的主要方向之一(谢毅和吴学民,2006;谢毅和吴学民,2007)。针对我们生产的病毒原粉含量高的特点(1g 5000亿 PIB/g的原粉可加工5亩次的制剂),选用先进的水分散粒剂这种新剂型可以充分发挥病毒生物农药环境友好的特点。依据1.4的病毒水分散粒剂生产流程,加工获得科云牌600亿 PIB/g的病毒水分散粒剂产品,农药临时登记证号:LS20071438。

科云牌600亿 PIB/g棉铃虫核型多角体病毒水分散粒剂产品的外观是干燥、能自由流动的灰褐色颗粒物,基本无粉尘,无可见的外来物和硬块。按照该产品的企业标准(Q/HJB 002-2006),合格的产品将达到表1的各项指标。

2.4 田间应用

经过2005年在新疆生产建设兵团大范围多点多地田间试验和药剂筛选试验的基础上(资料另文发表),2006年在新疆兵团示范推广科云 NPV 0.3万 hm^2 次,2007年进一步扩大推广面积,达0.7万 hm^2 次。实际应用效果和用户反映情况表明,高效、

超低用量的科云 NPV 经受了实践和市场的考验,大面积推广应用获得了成功。

表 1 科云牌 600 亿 PIB/克棉铃虫核型多角体病毒水分散粒剂技术要求

项 目	指 标
多角体含量, PIB/g	≥ 600 亿
水分, % (质量百分比)	≤ 2.5
筛分(湿筛, 通过 200 目筛), %	≥ 95
pH 值范围	5.0 ~ 7.0
悬浮率, %	≥ 70
润湿性, min	≤ 1
流动性, %	≥ 95
粒度范围(20 目 ~ 80 目), %	≥ 90
分散性, %	≥ 75
崩解性, min(250ml 量筒 1 克样品来回倾倒 10 次)	≤ 1.5
持久起泡性, ml(1min 后,)	≤ 15

3 讨论

3.1 生产规模

棉铃虫核型多角体病毒生物农药产业化项目从 2003 年开始,于 2004 年实现规模生产。研制出“棉铃虫群养技术”,突破了棉铃虫必须单头饲养的传统生产模式,每个养虫盒中接入 100 头左右 4 龄棉铃虫,最终可达到 70% 左右的收获率,大大节省了人工、饲料、空间等生产成本,使生产规模有所突破。

3.2 产品病毒含量

科云 HaNPV 原粉病毒多角体含量高达 5 000 亿 PIB/g,每克原粉可以加工使用 5 亩面积的制剂,是真正意义上的生物农药原药产品,可以为制剂加工企业生产原料,赋予了病毒生物农药工业化生产的特质。这样,在生产和制剂加工上,病毒生物农药具备了同化学农药竞争的潜力。目前原药产品

已出口到欧洲,被加工成制剂产品用于棉铃虫的生物防治。

3.3 剂型

如何获得方便使用,同时又不破坏生物活性的合适剂型,是生物活体农药成功商业化的关键。我们首次研制并生产了病毒水分散粒剂的剂型,产品中病毒多角体含量每克大于 600 亿 PIB,每亩用量仅为 2 ~ 3g,属超低用量制剂产品。该剂型的成功研制,不仅提升了生物活体农药制剂应用的水平,延长了产品的储存保质期,而且对推进病毒生物农药行业的发展,具有重要的实践意义。

4 展望

通过 5 年多的研发和生产,中科院动物所同河南省济源白云实业有限公司联合建成了年产能达 200 万 hm^2 次的病毒生物农药研发和生产基地,产品涵盖棉铃虫、甜菜夜蛾、斜纹夜蛾、小菜蛾等 4 种昆虫病毒 9 个类型的系列产品。产品应用在棉田、蔬菜、蚕桑等绿色、无公害农产品的生产,2006 至 2007 年推广应用面积达 13 万 hm^2 次,取得了较好的生态效益和经济效益。下一步将针对更多的重大农林害虫进行病毒生物农药的产业化开发,推动病毒生物农药行业的发展,为食品安全和害虫的无公害治理做出贡献。

参 考 文 献

- 1 Balch RE, Bird FT. *Sci Agric*, 1944, 25:65.
- 2 Fuxa JR. *Biotech Adv*, 1991, 9: 425 ~ 442.
- 3 Moscardi M, *Ann. Entomol*, 1999. 44: 257 ~ 289.
- 4 谢毅,吴学民. *农药科学与管理*. 2006. 25(10):37 ~ 39.
- 5 谢毅,吴学民. *世界农药*, 2007, 29(2):19 ~ 22.