

小菜蛾颗粒体病毒杀虫剂研究与应用进展

冯振群¹ 程清泉¹ 秦启联^{2*}¹河南省济源白云实业有限公司,河南济源 454652; ²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)

摘要 小菜蛾颗粒体病毒(*Plutella xylostella granulovirus*, PxGV)隶属杆状病毒科颗粒体病毒属,对小菜蛾具有较强的致病和杀灭作用,可以加工成环保安全的生物杀虫剂,用于防治小菜蛾。从病毒生物杀虫剂应用的角度,综述了PxGV的应用进展及影响其稳定性的主要因素,包括温湿度、pH值和紫外线等,并对其发展前景进行了展望。

关键词 小菜蛾颗粒体病毒;生物杀虫剂;应用

中图分类号 S482.3 文献标识码 A 文章编号 1007-5739(2009)18-0144-03

Studies and Application Advances on *Plutella Xylostella Granulovirus* Bio-insecticideFENG Zhen-qun¹ CHENG Qing-quan¹ QIN Qi-lian^{2*}¹ Henan Jiyuan Baiyun Industry Company Ltd., Jiyuan Henan 454652; ² State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences)

Abstract *Plutella xylostella granulovirus* (PxGV) is a baculovirus, which could be used to produce environment and safety bio-pesticide to control diamondback moth *Plutella xylostella*. In this paper some research results and application advances in PxGV as a baculoviral insecticide were summarized. Some environmental factors, such as temperature, humidity, pH, ultraviolet rays and et al were showed to impact the field efficiency of the bio-insecticide significantly. In the end, the perspective of development and application of the insecticide was discussed.

Key words *Plutella xylostella granulovirus*; bio-insecticide; application

小菜蛾(*Plutella xylostella*(L.))是发生在十字花科蔬菜上最具破坏性的世界性害虫之一,在东亚、东南亚及中国南部地区发生尤为严重,且持续时间长,为害范围广,防治难度大。由于其生长周期短、发生代数多、防治次数频繁,因而对杀虫剂极易产生抗药性,是目前抗药性最为严重的害虫之一,有时可造成90%以上的损失,全世界每年用于小菜蛾的防治费用高达10亿美元^[1-4]。

广谱性杀虫剂长期大量使用,不仅杀伤了天敌,而且使小菜蛾对很多杀虫剂产生了严重的抗药性,其中包括相对不易产生抗药性的昆虫生长调节剂和微生物杀虫剂,如抑太保、阿维菌素、刺糖菌素、Bt等^[5-8]。抗性的产生、化学防治的失效,以及对食品安全和生态保护的需求等,要求人们寻求安全有效、针对小菜蛾的新型防治措施。昆虫病毒杀虫剂具有专一性强、持效性长、害虫不易产生抗性等优点,成为控制抗性害虫新的行之有效的技术手段^[9]。该文针对小菜蛾颗粒体病毒的特点,从生物杀虫剂技术产品的角度,介绍了小菜蛾颗粒体病毒生物杀虫剂的应用前景。

1 小菜蛾颗粒体病毒

小菜蛾颗粒体病毒(*Plutella xylostella granulovirus*, PxGV)分属杆状病毒科颗粒体病毒属,是一种双链DNA包涵体病毒。光学显微镜下观察,病毒包涵体呈强折光性的颗粒;电子显微镜观察,包涵体呈长椭圆形,大小为320×185 nm,内部含有1个病毒粒子。病毒粒子由分子量为85 kb的DNA和蛋白衣壳组成,病毒感染力主要由DNA和蛋白衣壳的完整性决定,病毒粒子外包裹了致密晶格的颗粒体蛋白,形成病毒的包涵体。病毒包涵体对自然环境有较高的抵抗力^[10],可以通过小菜蛾幼虫活体增殖大量获得,经过适当的制剂

加工,生产出小菜蛾颗粒体病毒杀虫剂,用于田间小菜蛾的防治。

PxGV喷洒到田间,将成为影响小菜蛾种群数量的重要因子,因而用于防治小菜蛾时,效果非常显著。PxGV具有较强的专化性,对其他非靶标动物和环境安全,害虫不易产生抗性,后效作用也非常明显。当患病虫体死亡时,在体内得到扩增的病毒释放到环境中,可以水平传播,成为健康虫体的侵染源。当环境条件适合时,有可能在小菜蛾种群中造成病毒病的流行^[2,9]。但PxGV是生物活体,在一定条件下,杀虫活性会受到影响,特别是高温、紫外线和pH值等,是影响PxGV活性非常重要的环境因子。

2 影响PxGV稳定性的主要物理因素

2.1 温度和湿度

PxGV在0℃以下活性保持较好,特别是在干冰(-78℃)和液氮(-196℃)中,杀虫活性基本不会丧失,总体趋势为温度越低,活性维持越久。相反,在50~60℃下,30 min即被灭活;100℃时,几秒钟内即能丧失活性^[11]。范晓军等^[12]的研究表明,多角体病毒在温度4~50℃时,可以保持较高的毒力稳定性。在15~25℃之间,染病幼虫的死亡速度随温度的增加呈线性升高,而在30℃时,上升率开始下降^[13]。Watanabe等^[14]研究发现,-80~25℃间的不同温度下,PxGV以悬液状态储存2年后,活性在各个温度均不会明显降低;80℃下病毒悬液很快被灭活,但在干燥的条件下可以耐120℃高温30 min。

2.2 pH值

杆状病毒在pH值6.0~8.0范围内比较稳定,可以保持较高的毒力,而pH值在5.0以下或者9.0以上时容易灭活^[11,12]。吕利华等^[15]研究表明,无论是高浓度还是低浓度的PxGV悬液,中性溶液(pH=7)处理的小菜蛾幼虫发病率最高,降低或提高pH值,病毒的致病力均呈下降趋势。有研究发现^[14],PxGV在pH值10左右和小于2时活性降低严重。如当病毒悬液pH值为14.01和6.86时,其校正死亡率分别为100%;

基金项目 中国科学院知识创新工程重点方向项目“微生物杀虫剂产业化关键技术研究”(KSCX2-YW-G-040)。

作者简介 冯振群(1980-),男,河南信阳人,硕士研究生,主要从事昆虫病毒杀虫剂研制开发工作。

* 通讯作者

收稿日期 2009-06-12

而 pH 值为 1.68、9.18 和 10.02 时,其校正死亡率分别为 31.0%、92.3%和 10.3%。因此,必须将 pH 值控制在一定的范围内才能保持较高的病毒活性。

2.3 紫外线

有研究表明,紫外线照射对 PxGV 灭活作用随照射时间的增长而增强,而且被紫外线照射的 PxGV 浓度越高被灭活所需的时间也就越长。Watanabe 等^[14]研究表明,相同浓度的病毒悬液在 253.7nm 波长的紫外线下(20W,40cm 距离),分别照射 30s、60s、240s、960s、1920s,小菜蛾死亡率分别为 100%、86.2%、57.4%、19.4%和 0。吕利华等^[15]研究,当病毒浓度为每升 0.5 幼虫当量(larval equivalent /liter,LE/L)时,紫外线照射 5min,病毒的灭活率为 43.3%,而照射 35min 时,灭活率仅有 7.74%;而病毒浓度为 5LE/L 时,照射 60min 灭活率却仍高达 53.06%以上。

3 PxGV 毒力与虫龄的关系

PxGV 对小菜蛾的毒力与小菜蛾幼虫的龄期有很大关系。小菜蛾对 PxGV 的敏感性与虫龄呈负相关,即虫龄越低越敏感,而高龄幼虫表现出一定的抵抗力。对 1~3 龄幼虫,PxGV 表现出高度传染性;当幼虫处于 4 龄(末龄)时,PxGV 对其基本没有感染力^[13]。这种 PxGV 毒力同小菜蛾虫龄的关系也存在于其他杆状病毒中,其中包括重组杆状病毒。不同虫龄的棉铃虫对重组病毒的毒力敏感性差异显著,两者呈负相关^[12,16]。

4 PxGV 对小菜蛾种群的控制

莫美华等^[17]研究表明,PxGV 对小菜蛾种群的控制作用非常明显。在 1~2 龄幼虫期施药后,除了直接杀死 1~2 龄幼虫外,对种群的控制作用也非常明显,表现在 3~4 龄幼虫、蛹、成虫的存活率下降,成虫的产卵量减少,最终导致种群呈逐渐下降的趋势。相反,使用化学杀虫剂,短期内小菜蛾的死亡率很高,但下代种群数量将比不采取任何防虫措施的对照上升得还要快,造成害虫的再猖獗。种群再猖獗的主要原因是,广谱性化学杀虫剂在杀灭害虫的同时,也杀死了大量的天敌,使后代小菜蛾种群失去自然控制因子。

5 PxGV 的应用研究

为解决 PxGV 的杀虫对象单一和杀虫速度相对缓慢的缺点,人们采取多种措施以扩大其杀虫谱或增强其杀虫效果。如通过添加生物活性物质增强其毒力;将增效因子作为杀虫剂佐剂加以利用;利用基因工程技术对 PxGV 进行改造^[18];或者与其他物质或技术配合应用等等。

5.1 PxGV 与其他生物因子混合的增效作用

袁哲明等^[19]研究表明,Bt 与 PxGV 复合微生物杀虫剂既保持了 Bt 的广谱性和速效性,又保证了对抗 Bt 小菜蛾的特异性和持续性,二者有增效作用,防效比单用病毒或细菌提高 14.97%~16.48%。吴华等^[19]田间试验结果也表明,PxGV 与 Bt 混合悬浮剂对小菜蛾有较好的防治效果,药后 5 d,混合悬浮剂的防效为 77.46%,明显高于对照药剂高效 Bt 可湿性粉剂,其药后 7 d 防治效果仍达 75.89%。

田间使用 PxGV 和菜青虫颗粒体病毒(*Pieris rapae granulovirus*,PrGV)的混合物可以有效控制小菜蛾和菜青虫,而 PxGV 和 PrGV 混合感染小菜蛾比单用 PxGV 能明显提高

感染率,缩短病毒潜伏期^[20]。

孟小林等^[21]研究认为,使用 PxGV 与卵磷脂混合添食感染 2~3 龄小菜蛾幼虫,PxGV+70mg/mL 卵磷脂与 PxGV 对照组比较,感染性提高 17%,LT₅₀ 提前 1.066d,说明卵磷脂对小菜蛾颗粒体病毒的毒力具有促进作用。因卵磷脂可促进病毒粒子对中肠微绒毛细胞质膜的吸附作用,从而提高了 PxGV 对小菜蛾的感染率,加快死亡进程。

1992 年 Shapiro 首次报道了荧光增白剂的增效作用,并推测可能是通过破坏围食膜而达到增效作用。Wang 等研究荧光物质 Calcoflour 对围食膜的破坏作用,证实 Shapiro 的推测,认为 Calcoflour 是几丁质结合物,能竞争性地结合到中肠新合成的几丁质上,阻止了围食膜蛋白与几丁质的结合,破坏了围食膜的结构,从而促进病毒粒子进入中肠细胞,提高了杀虫速度和效率。

5.2 PxGV 与其他物质或技术配合的诱杀作用

昆虫性诱剂的控制作用主要有诱杀雄性成虫和干扰成虫正常交尾 2 个方面,王香萍等^[22]、侯有明^[23]、王红托等^[24]均对小菜蛾性诱剂的诱蛾效果进行了研究。目前以中科院为主的各单位正在全国各地研究利用小菜蛾性诱剂诱芯与 PxGV 配合的技术方法,防治田间小菜蛾。从初期的试验来看,效果比较理想。

另外,还可以利用蜂蜜、糖醋液或其他已经商品化的诱食剂进行食物趋性诱杀。曾建德^[25]通过将 20%蜂蜜与 PxGV 混用,诱使小菜蛾成虫接触 PxGV,进而传播感染小菜蛾幼虫,结果表明,这种措施能引起子代幼虫感染致死率达 12.3%。

5.3 PxGV 的基因工程改造

利用基因工程手段,去除某些不影响病毒复制和感染的基因,将外源对靶昆虫专一性的激素、酶、毒素等基因,如利尿激素基因、Bt 杀虫蛋白基因、蝎神经毒素基因等,通过基因工程技术,重组到昆虫杆状病毒的基因组中,或对病毒自身的某些基因进行修饰改造,获得重组病毒,以提高病毒毒力,加快杀虫速度或扩大宿主范围。有研究表明,工程病毒对害虫致病时间可缩短 25%~40%,进食量可减少 30%~50%,防治效果明显改善^[26]。

6 展望

昆虫杆状病毒作为生物杀虫剂,具有对非靶标生物安全、对人畜无害、不污染环境、专一性强、在自然界中较稳定、生产使用方便、持效性强、害虫不易产生抗性等优点,是 21 世纪最具发展潜力的生物农药,必将在控制农林害虫、保护生态平衡、减少环境污染等方面发挥显著的作用^[27,28]。但也存在着许多问题需要解决,如需要进一步稳定病毒的工业化生产工艺,有效控制病毒和其他病原物(微孢子虫、细菌、真菌等)在虫体间的交叉感染,解决病毒在紫外光及日光下易失活等问题。目前,病毒杀虫剂与性诱剂或诱食剂混合的技术和应用,引起了科研工作者的浓厚兴趣,可能将代表今后病毒生物农药在田间应用的发展方向,使病毒生物农药的研制和应用跨上一个新的台阶。

分析国内外农药市场对杆状病毒杀虫剂的需求,特别在西方发达国家,将呈现迅速上升的趋势,在昆虫杆状病毒生

产和应用技术研究方面,我国已处于世界先进行列中,加上具有劳动力资源的优势,大力发展这一产业优势凸显,将为保护全球生态环境做出贡献。

7 参考文献

- [1] ALI H S, MOHSIN R R, ANWAAR H A, et al. Management of diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae): a lesson from south east Asia for sustainable integrated pest management [J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2002, 5(2): 234-245.
- [2] 吕利华, 冯夏, 陈焕瑜, 等. 颗粒体病毒对不同蔬菜上小菜蛾实验种群的控制作用[J]. 昆虫知识, 2006, 43(1): 74-78.
- [3] 张纯青, 刘化宙. 蔬菜病虫害的抗药性及其治理对策[J]. 温州农业科技, 2005(3): 1-3.
- [4] TALEKAR N S, SHELTON A M. Biology, ecology and management of the diamondback moth [J]. Annual Review of Entomology, 1993(38): 275-301.
- [5] 吴永汉, 邵建寨, 张纯青, 等. 温州市小菜蛾田间抗药性测定[J]. 上海农业科技, 2005(3): 102-103.
- [6] 何玉仙, 杨秀娟, 翁启勇. 小菜蛾抗药性研究及其治理[J]. 江西农业大学学报, 23(3): 321-325.
- [7] 魏辉, 赵士熙, 胡进锋, 等. 寄主植物对小菜蛾田间种群抗药性衰退及其酯酶活性的影响[J]. 福建农林大学学报, 2006, 35(2): 138-142.
- [8] 赵锋. 小菜蛾抗药性监测、抗性选育及抗性生化机理研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2005.
- [9] 匡石滋, 王晓容, 张慧, 等. 两种昆虫病毒制剂对菜粉蝶和小菜蛾的田间防治效果[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2005, 18(2): 25-27.
- [10] 杜严华, 丘冠英, 李国红, 等. 低能离子束及 γ 辐照对小菜蛾颗粒体病毒的影响及剂量效应关系的拟合分析[J]. 生物物理学报, 1997, 13(2): 267-272.
- [11] 杨占秋. 诊断与实验病毒学[M]. 郑州: 郑州大学出版社, 2002.
- [12] 范晓军, 许成钢, 柴宝峰, 等. 温度和pH值对重组杆状病毒(AcM-NPV-BmKIT-Chi)的毒力影响[J]. 应用与环境生物学报, 2007, 13(3): 338-340.
- [13] WATANABE T, AOKI T. Studies on granulosis virus of *Plutella xylostella* I. Infectiveness of the granulosis virus collected from cabbage field in Kagawa prefecture[J]. Kagawa Agric. Exp. Stn., 1994(45): 63-70.

(上接第143页)

表2 菌株发酵滤液对根结线虫抑制分散卵粒孵化结果

处理	散卵数//个	孵化数//个	孵化率//%	抑制孵化率//%
CK	76.0	35.0	46.1	-
19	85.0	28.0	32.9	28.6
N13	91.0	32.0	35.2	23.6
Np6	88.0	40.0	45.5	1.3
1	93.0	43.0	46.2	-
3	82.0	25.0	30.5	33.8
N11	96.0	35.0	36.5	20.8
N12	73.0	42.0	57.5	-

化率均高于CK,即高于只加乳酸。加入乳酸后,乳酸抑制了菌株19、1、N11、N12的生长,明显促进了卵的孵化。只有菌株N13、Np6、3加入乳酸后对卵的孵化有一定抑制作用,但抑制孵化率明显低于不加乳酸。实验时观察以上7菌株加入乳酸后,都明显促进卵孵化,但虫的死亡率很高,尤

表3 菌株结合有机酸对根结线虫抑制分散卵粒孵化结果

处理	散卵数 个	孵化数 个	孵化率 %	抑制孵化率 %	孵化后死亡虫数 个	死亡率 %
CK	101.0	28.0	27.7	-	24.0	85.7
19	57.0	16.0	28.1	-	4.0	66.7
N13	104.0	21.0	20.2	27.1	17.0	81.0
Np6	122.0	27.0	22.1	20.2	23.0	85.2
1	69.0	21.0	30.4	-	10.0	47.6
3	119.0	27.0	22.7	18.1	19.0	70.4
N11	87.0	26.0	29.9	-	20.0	76.9
N12	99.0	34.0	34.0	-	27.0	79.4

- [14] WATANABE T, AOKI T. Studies on the granulosis virus of *Plutella xylostella* II. Influences of temperature, pH, dryness and ultraviolet rays on the granulosis virus of *Plutella* collected from the cabbage field [J]. Kagawa Agric. Exp. Stn., 1996(47): 79-84.
- [15] 吕利华, 何余容, 庞雄飞. 酸碱度与紫外线对小菜蛾颗粒体病毒稳定性的影响[J]. 中国生物防治, 2001, 17(1): 45-46.
- [16] 袁哲明, 刘树生, 孟小林. 小菜蛾病原微生物研究进展[J]. 中国生物防治, 1999, 15(2): 85-89.
- [17] 莫美华, 庞雄飞. 小菜蛾颗粒体病毒对小菜蛾防治作用的评价[J]. 生态学报, 1999, 19(5): 724-727.
- [18] WASHBURN J O, KIRKPATRICK B A, HAAS-STAPLETON E, et al. Evidence that the stilbene-derived optical brightener M2R enhances autographa californica nucleopolyhedrovirus infection of *Trichoplusia ni* and *Heliothis virescens* by preventing of sloughing of infected midgut epithelial cells [J]. Biological Control, 1998(11): 58-69.
- [19] 吴华, 黄鸿, 欧剑峰, 等. 小菜蛾颗粒体病毒与苏云金杆菌混合悬浮剂防治小菜蛾的田间药效试验[J]. 昆虫天敌, 2004(3): 11-13.
- [20] SU C Y. The evaluation of granulosis and nuclear polyhedrosis viruses for control of three lepidopterous insect pests on cruciferous vegetables [J]. Chinese Journal of Entomology, 1989(9): 189-196.
- [21] 孟小林, 侯小辉, 夏军, 等. 卵磷脂促进小菜蛾颗粒体病毒感染的研究[J]. 中国病毒学, 1993, 8(2): 189-192.
- [22] 王香萍, 方宇凌, 张钟宁. 小菜蛾性信息素研究及应用进展[J]. 植物保护, 2003, 29(5): 5-9.
- [23] 侯有明. 性诱剂对蔬菜大棚小菜蛾种群控制效应的研究[J]. 中国生物防治, 2001, 17(3): 121-125.
- [24] 王红托, 宣维健, 何广全等. 二种小菜蛾性诱剂诱芯田间诱蛾效果比较[J]. 昆虫知识, 2008, 45(5): 806-807.
- [25] 曾建德. 取食刺激物在害虫防治中的应用[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2005.
- [26] 曹建斌, 范晓军, 梁爱华. 杆状病毒及其应用[J]. 科技情报开发与经济, 2007, 17(15): 131-132.
- [27] 刘青娥, 夏更寿. 小菜蛾生物防治研究进展[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(10): 1919-1920, 2002.
- [28] 袁哲明, 游兰韶. 重组昆虫杆状病毒杀虫剂研究进展[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2001, 27(6): 491-495.

其是只加乳酸的死亡率最高,可见菌株结合有机酸对根结线虫卵孵化的抑制作用有很大影响。

3 讨论

通过上述3种处理方法表明,以上7菌株对线虫分散卵孵化均表现出一定的抑制作用,其中3、N13、19抑制孵化率均超过50%,抑制效果较好;其发酵滤液有一定的抑制卵孵化作用,但抑制孵化率仅在23.6%~33.8%,抑制作用较小。菌株结合有机酸对虫根结线虫卵孵化的抑制作用有一定影响,但还需对乳酸浓度进一步调节,观察加入乳酸后对虫根结线虫卵孵化的抑制作用的影响。

目前防治植物根结线虫的农药有十几种,但这些农药大多是高毒农药,对环境威胁大,因此开发高效低毒的生物杀线剂显得尤为重要,菌株3、N13、19对根结线虫卵孵化的抑制表现很好,是非常有潜力的生物防治资源。

4 参考文献

- [1] 徐建华, 李仁梅, 沈培根, 等. 南方根结线虫群体间致病性变异的生物测定[J]. 南京农业大学学报, 1999, 22(3): 33-36.
- [2] 陈淑鸿, 高学彪. 淡紫拟青霉MCWA18菌株对爪哇根结线虫卵孵化率的影响[J]. 中国生物防治, 2000, 16(2): 78-80.
- [3] 安呈海. 我国杀线虫剂现状[J]. 江苏农药, 2000(1): 10-11.
- [4] 刘维志. 植物病原线虫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [5] 张雯, 倪莉, 刘国坤, 等. 淡紫拟青霉产几丁质酶特性及其对根结线虫卵的侵染作用[J]. 莱阳农学院学报, 2004, 21(2): 139-142.
- [6] 林华峰, 李连德, 李增智, 等. 白僵菌胞外蛋白酶的测定及其与酯酶型的关系[J]. 中国生物防治, 1997, 13(1): 32-36.