

斑螋素对灰斑古毒蛾核型多角体病毒的增效作用

彭炳兰<sup>1,2</sup>, 梁召俊<sup>1</sup>, 易 命<sup>1</sup>, 王 敦<sup>1\*</sup>

(1. 西北农林科技大学 植物保护学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 青海省湟中县林业技术推广中心, 青海 西宁 811600)

**摘 要:**利用斑螋素作为灰斑古毒蛾(*Orgyia ericae*)核型多角体病毒(OrerNPV)的生物增效剂, 研究探讨斑螋素对 OrerNPV 室内毒力和林间防治效果的作用。通过室内对病毒制剂添加不同浓度的微量斑螋素, 测定分析其对 OrerNPV 毒力的增效作用, 对增效作用进行了林间测试。研究发现, 室内条件下斑螋素对 OrerNPV 毒力具有显著的增效作用, 能够显著缩短病毒对害虫的致死时间、并提高致死率; 同时, 斑螋素作为增效剂显著提高了 OrerNPV 对灰斑古毒蛾的林间防治效果。

**关键词:**灰斑古毒蛾; OrerNPV; 斑螋素; 增效作用; 生物防治

**中图分类号:**S767.3      **文献标志码:**A      **文章编号:**1001-7461(2015)06-0182-04

Synergetic Effect of Cantharidin on *Orgyia ericae* Nucleopolyhedrovirus against Host Insects

PENG Bing-lan<sup>1,2</sup>, LIANG Zhao-jun<sup>2</sup>, YI Ming<sup>2</sup>, WANG Dun<sup>2\*</sup>

(1. College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;  
2. Forest Technology Center of Huangzhong County, Xining, Qinghai 811600, China)

**Abstract:**Cantharidin was used as the virulence enhancer for *Orgyia ericae* nucleopolyhedrovirus (OrerNPV) against its host insects. The tests were done by bioassay in lab and in the forests. The results indicated that the  $LT_{50}$  and  $LT_{90}$  values were both reduced significantly and the mortality was also increased significantly when cantharidin was supplemented as biological enhancer. Moreover, the field assay showed that the control effect was improved significantly also by cantharidin.

**Key words:***Orgyia ericae*; OrerNPV; cantharidin; virulence enhancement; biological control

早在 19 世纪末人们就已开展了利用昆虫病毒防治害虫<sup>[1]</sup>, 1975 年由美国 Sandoz 公司研发的美洲棉铃虫 NPV(HzNPV)以商品名 Elcar<sup>TM</sup> 获得美国 FDA 的农药登记, 自此拉开了使用昆虫病毒防治害虫的序幕<sup>[2]</sup>。20 世纪 70 年代初, 杆状病毒被 FAO/WHO 推荐为一种安全的生物杀虫剂用于害虫防治。杆状病毒杀虫剂应用最成功的例子是巴西的豆夜蛾 NPV, 在近 100 万  $hm^2$  的大豆上应用, 每年可节省费用 1 100 万美元, 同时还免去了  $1\,700 \times 10^4$  t 化学农药的使用, 具有巨大的经济和生态效益<sup>[3]</sup>。迄今, 已有 50 多种农林害虫得到了有效的防治, 国内的棉铃虫核型多角体病毒和斜纹夜蛾核型多角体病毒等均已被研发为商业化生产的生物杀虫

剂<sup>[4]</sup>。虽然昆虫病毒杀虫剂具有致病力强、作用持久、专一性强、对环境无害等多种优点; 但其自身的缺点也很显著: 病毒只能在活体中繁殖, 生产成本和防治成本均相对昂贵; 另外, 病毒感染昆虫作用时间慢, 通常需要 1 周以上的时间才能杀死害虫, 这无疑给染病后害虫留下了充足的时间造成农林作物的巨大损失<sup>[5]</sup>。因此, 如何利用增效剂提高昆虫病毒的杀虫效率、缩短杀虫时间, 是当今昆虫病毒生物防治领域的研究热点<sup>[6]</sup>。

灰斑古毒蛾(*Orgyia ericae*)是危害旱生植物的重要害虫, 主要危害柠条(*Caragana korshinskii*)、沙棘(*Hippophae rhamnoides*)、沙冬青(*Am-mopiptanthus mongolicus*)、花棒(*Hedysarum sco-*

收稿日期: 2015-03-24    修回日期: 2015-07-06

基金项目: 国家自然科学基金(30872033)。

作者简介: 彭炳兰, 女, 工程师, 研究方向: 森林保护。E-mail: 769241542@qq.com

\* 通信作者: 王敦, 博士, 教授, 研究方向: 昆虫病毒与昆虫生化。E-mail: wanghande@nwsuaf.edu.cn

*parium*)、沙枣(*Elaeagnus angustifolia*)、榆树(*Ulmus pumila*)、苹果(*Malus pumila*)等,特别是对旱区灌木林和荒山绿化人工林危害极为严重。灰斑古毒蛾核型多角体病毒(*O. ericae* nucleopolyhedrovirus, OerNPV)是对灰斑古毒蛾专一性较高的病原微生物,具有很好的杀虫效果<sup>[7]</sup>。本研究利用斑蝥素作为 OerNPV 的生物增效剂,探讨利用生物源增效剂提高昆虫病毒杀虫剂的防治效果,以期为提高昆虫病毒杀虫效率、降低防治成本和新的昆虫病毒增效剂的研发提供新的素材。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试虫灰斑古毒蛾(*Orgyia ericae*)越冬卵采自青海西宁湟中县荒山绿化沙棘林(101°56′22″E,36°48′33″N)。越冬卵经过 5%(v/v)的 84 消毒液水溶液表面消毒后,置于 24℃ 培养箱孵化,孵化的幼虫用新鲜沙棘叶喂养。至 2 龄末期蜕皮后,饥饿过夜,用于测定。

灰斑古毒蛾核型多角体病毒(OerNPV)由西北农林科技大学昆虫研究所分子病毒学实验室提供。室内测定给毒剂量为 100 PIB/幼虫。

斑蝥素纯品(纯度 99.5%)由西北农林科技大学昆虫研究所资源昆虫实验室提供。其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 室内毒效测定 将灰斑古毒蛾 2 龄试虫饲养至蜕皮后,饥饿 24 h,然后挑选蜕皮后大小均一的 3 龄幼虫 525 只,随机分为 15 个重复,每重复为 35 只幼虫;每 3 个重复为 1 组作为一个处理,按以下不同处理给药。预试验证明该斑蝥素饲喂剂量无致死和影响正常生长作用,非感染对照组(CK<sub>0</sub>)采用无病毒对照(含 1.5 μg · mL<sup>-1</sup>斑蝥素的无菌水),其死亡率用来计算校正死亡率。饲喂剂量 2.0 μL/只、不含病毒。

病毒感染采用剂量为 100 PIB/幼虫,分为 2 个不同处理。单纯病毒感染对照(CK<sub>v</sub>):未添加斑蝥素衍生物的单纯 OerNPV 病毒(含等量丙酮)感染组,其死亡率用于比较增效剂添加处理组的病毒毒力增效效果。

斑蝥素添加病毒感染组作为测试组,其中斑蝥素添加处理包括 3 个不同终浓度:0.5、1.0、1.5 μg · mL<sup>-1</sup>。均先溶解于丙酮,再稀释为水溶液,最后加入病毒颗粒混匀;饲喂量 2.0 μL/只。

饥饿处理后的 5 组幼虫,每组喂食滴加上述不

同处理液体的沙棘叶片(约 2 mm<sup>2</sup>),24 h 后挑选完全取食不同处理叶片的幼虫,逐日统计各组死亡率。

CK<sub>v</sub> 校正死亡率:病毒感染处理组(未加增效物质)的死亡率,以 CK<sub>0</sub> 的死亡率作为空白对照计算校正死亡率。

斑蝥素添加病毒感染组校正死亡率:添加斑蝥素后病毒感染造成的死亡率,以 CK<sub>0</sub> 的死亡率作为空白对照计算校正死亡率。

1.2.2 林间防效测定 对照与斑蝥素添加组试验方案设置同上,分别为:喷施对照 CK<sub>0</sub>(非防治组)、CK<sub>v</sub>(单纯病毒防治组)、在病毒制剂中分别添加终浓度为 0.5、1.0、1.5 μg · mL<sup>-1</sup>的斑蝥素作为增效剂试验组。

试验地以对角线法在山坡中上部沙棘林中选取 5 个样点,每个样点之间间距>100 m,每个样点为 1 个处理,每个样点随机选择 3 棵树进行防治试验。在 6 月中旬灰斑古毒蛾幼虫 80% 进入 2~3 龄时开始喷施不同处理药剂,第 1 次喷施后间隔 1 周重复 1 次,共施药 2 次。

于喷施 2 月后(8 月中旬)检查防效,对各样点的沙棘上的灰斑古毒蛾发生情况进行调查统计。每株选上、中、下 3 个部位,东西南北 4 个方向,共 12 个部位,每个部位统计有被害叶片的枝条和健康枝条数量,用以计算被害枝率;并随机选 3 个长度为 50 cm 左右枝条为标准枝,逐个统计标准枝虫口密度。

### 1.3 数据分析

比较斑蝥素添加病毒感染组校正死亡率与 CK<sub>v</sub> 校正死亡率二者的差异,所有数据统计采用 DPS 软件,采用 *t* 检验分析差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 添加斑蝥素对 OerNPV 致死时间的影响

2.1.1 斑蝥素添加对 OerNPV LT<sub>50</sub> 的影响 斑蝥素对灰斑古毒蛾核型多角体病毒具有显著的增效作用。添加剂量达到 1.0 μg · mL<sup>-1</sup>即可产生显著的增效作用(*p*<0.05),LT<sub>50</sub> 较单纯病毒组缩短了 20.2%;当添加剂量达到 1.5 μg · mL<sup>-1</sup>时,LT<sub>50</sub> 缩短了 26.35%(表 1)。LT 值的缩短,说明斑蝥素的添加加速了病毒对害虫的致死速度、使害虫提前死亡,达到降低害虫对森林植物危害的效果。

2.1.2 斑蝥素添加对 OerNPV LT<sub>90</sub> 的影响 在病毒制剂中添加斑蝥素达到 1.0 μg · mL<sup>-1</sup>即可产生显著的增效作用(*p*<0.05),相比单纯病毒感染的对照 LT<sub>90</sub> 值显著降低(*p*<0.05),在 1.5 μg ·

mL<sup>-1</sup>的添加水平,LT<sub>90</sub>值比单纯病毒感染对照降低了16.16%。斑蝥素对 OerNPV 的增效作用,无论对 LT<sub>50</sub> 还是 LT<sub>90</sub>,均有类似的效果(表 2)。

表 1 添加斑蝥素对 OerNPV LT<sub>50</sub> 的影响  
Table 1 The effect of cantharidin on LT<sub>50</sub> value of OerNPV

斑蝥素添加浓度 /(μg·mL <sup>-1</sup> )	LT <sub>50</sub>	LT <sub>50</sub> 降低率/%	95%置信区间	
			下限	上限
1.5 (CK <sub>0</sub> )	/	/	/	/
0 (CK <sub>V</sub> )	6.83a	/	5.91	7.44
0.5	6.21a	9.08	5.49	6.92
1.0	5.45b	20.20	4.96	6.05
1.5	5.03b	26.35	4.54	5.49

注:同列数据标注不同字母表示与 CK<sub>V</sub> 相比差异显著( $p<0.05$ ),表 2 同。

表 2 OerNPV 添加斑蝥素对其 LT<sub>90</sub> 的影响  
Table 2 The effect of cantharidin on LT<sub>90</sub> value of OerNPV

斑蝥素添加浓度 /(μg·mL <sup>-1</sup> )	LT <sub>90</sub>	LT <sub>90</sub> 降低率 %	95%置信区间	
			下限	上限
1.5 (CK <sub>0</sub> )	/	/	/	/
0 (CK <sub>V</sub> )	8.91a	/	8.01	9.79
0.5	8.42a	5.5	7.91	9.15
1.0	7.63b	14.37	7.08	8.37
1.5	7.47b	16.16	6.92	8.18

## 2.2 斑蝥素添加对 OerNPV 毒力的影响

无论斑蝥素添加与否,病毒感染对灰斑古毒蛾都有很强的致死作用,最终死亡率均达 90% 以上。添加斑蝥素后病毒感染能够显著提高致死率,在感染后第 5 天斑蝥素添加组的死亡率均显著高于病毒感染组(CK<sub>V</sub>),特别是在 1.0 μg·mL<sup>-1</sup> 剂量以上,与 CK<sub>V</sub> 相比差异极为显著( $p<0.01$ );但最终致死率,斑蝥素添加水平 0.5 μg·mL<sup>-1</sup> 感染组与 CK<sub>V</sub> 类似、差异不显著,只有剂量高于 1.0 μg·mL<sup>-1</sup> 的添加水平,与 CK<sub>V</sub> 相比差异显著( $p<0.05$ )。说明剂量在 1.0 μg·mL<sup>-1</sup> 的斑蝥素添加即能够显著提高 OerNPV 对灰斑古毒蛾的毒力,增效作用显著(表 3)。

## 2.3 斑蝥素添加对 OerNPV 田间防效的影响

为进一步明确斑蝥素对 OerNPV 的增效作用,对野外沙棘林中的灰斑古毒蛾林间防治效果(表 4)表明,与未用病毒防治的对照(CK<sub>0</sub>)相比,无论是否采用了增效剂,应用 OerNPV 防治灰斑古毒蛾效果显著( $p<0.05$ );当添加斑蝥素作为增效剂后,防效进一步提升,与单纯病毒防治组(CK<sub>V</sub>)相比,斑蝥素添加剂量达到 1.0 μg·mL<sup>-1</sup> 以上时差异显著,枝条被害率和标准枝虫口数均较 CK<sub>V</sub> 显著下降( $p<0.05$ ),说明斑蝥素作为 OerNPV 生防制剂的增效剂效果显著。

表 3 斑蝥素添加对 OerNPV 致死率的影响  
Table 3 The enhancement of cantharidin on mortality of OerNPV against *O. ericae*

斑蝥素添加 浓度/(μg·mL <sup>-1</sup> )	致死率/%	
	感染后第 5 天	感染后第 12 天
1.5 (CK <sub>0</sub> )	3.33±0.27	3.33±0.27
0 (CK <sub>V</sub> )	24.83±2.03aA	90.11±8.41a
0.5	35.97±2.71b	92.25±9.15a
1.0	45.26±6.29B	100±11.43b
1.5	48.52±5.55B	100±10.23b

注:同列数据标注不同小写字母表示与 CK<sub>V</sub> 相比差异显著( $p<0.05$ );同列数据标注不同大、小写字母表示与 CK<sub>V</sub> 相比差异极显著( $p<0.01$ )。

表 4 应用增效剂田间防效分析  
Table 4 The control effect in the field with cantharidin supplementation

斑蝥素添加 浓度/(μg·mL <sup>-1</sup> )	受害率	
	被害枝条比例	标准枝平均虫口数
1.5(CK <sub>0</sub> )	96.3±11.4a	9.8±1.1a
0 (CK <sub>V</sub> )	13.9±2.1b	3.1±0.3b
0.5	11.7±1.0b	2.7±0.3b
1.0	5.3±0.7b*	1.5±0.9b*
1.5	4.4±0.5b*	1.2±0.2b*

注:同列数据标注不同字母表示与 CK<sub>0</sub> 相比差异极显著( $p<0.01$ ),\* 号表示与 CK<sub>V</sub> 相比差异显著( $p<0.05$ )。

## 3 结论与讨论

昆虫病毒增效剂已有许多研究报道,其中主要集中在化学增效剂方面,其中,化学增效剂包括杀虫剂、荧光增白剂、抗紫外线保护剂等<sup>[6,8-10]</sup>,而生物源增效剂研究报道相对较少<sup>[11-12]</sup>。近年来的研究发现,来自于昆虫的一些活性物质不仅对害虫具有较强的胃毒作用<sup>[13]</sup>,对于病毒杀虫剂具有显著增效作用<sup>[14]</sup>。斑蝥素(Cantharidin)是一种源于鞘翅目芫菁科昆虫的单帖类毒素,具有杀虫、除草、抗病毒、抗菌等作用<sup>[15-16]</sup>。对于斑蝥素的杀虫作用及其机理进行了系统的研究,发现其能够作用于害虫中肠的 ALP 和 GST 等与中肠防御相关的酶类、下调这些蛋白编码基因的表达水平、削弱害虫中肠的防御功能<sup>[17-18]</sup>,而这种削弱作用,有可能会给病原微生物的入侵提供良好契机。因此,本研究尝试利用斑蝥素作为生物源增效剂,探讨了其对 OerNPV 的增效作用。研究结果表明斑蝥素能够显著提高病毒杀虫剂的杀虫效果,无论室内生测还是林间防治效果,均有显著提高。但其对病毒增效作用是否与其对中肠的防御相关蛋白表达水平下调相关,尚需进一步深入研究。另一方面,由于人工沙棘林存在明显的早衰现象,害虫的危害会进一步加剧沙棘林的衰退<sup>[19]</sup>,利用昆虫病毒和病毒增效剂有效防治沙棘害虫有望为挽回人工沙棘林的早衰提供辅助措施。

斑蝥素对 OrerNPV 毒力具有显著的增效作用,能够显著缩短病毒对害虫的致死时间、并提高致死率;林间试验效果也证明斑蝥素能够显著提高 OrerNPV 对灰斑古毒蛾的防效。

参考文献:

[1] BECKAQE N. The range of insect virus[J]. Bioscience, 2000, 50(4):371-373.

[2] IGNOFFO C M, COUCH T L. Microbial control of pests and plant diseases[M]. London:Academic, 1981:329-362.

[3] MOSCARDI F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera[J]. Annual Review Entomology, 1999, 44(1):257-289.

[4] 王玲玲,樊虹,徐艳玲,等. 昆虫病毒在害虫生物防治中的应用[J]. 沈阳农业大学学报, 2004, 35(1):76-79.

WANG L L, FAN H, XU Y L, *et al.* The application of insect virus in controlling pest[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2004, 35(1):76-79. (in Chinese)

[5] IGNOFFO C M, HEIMPEL A M. The nuclear-polyhedrosis virus of *Heliothis zea* (boddie) and *Heliothis virescens* (fabricius);IV. bioassay of virus activity [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1965, 7(3):329-340.

[6] WU Z W, FAN J B, YU H, *et al.* Ultraviolet protection of the *Cydia pomonella* granulovirus using zinc oxide and titanium dioxide[J]. Biocontrol Science and Technology, 2015, 25(1):97-107.

[7] YANG L R, WANG D, ZHANG C X. Polyhedrin gene sequence and phylogenetic analysis of a nucleopolyhedrovirus I-solated from *Orgyia ericae* Germar [J]. DNA Sequence, 2006, 17(3):215-222.

[8] TIM L, ROOZBEH P, PERRY E, *et al.* Photocatalytic activity of hydrogenated TiO<sub>2</sub>[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2013, 5(6):1892-1895.

[9] ZHU Y C, LU H X, HE D H, *et al.* Synthesis, fluorescence properties and applications of two novel oxadiazole-based stilbene optical brighteners as UV protectants for insect baculovirus[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B:Biophysics, 2013, 125(5):8-12.

[10] ALEXANDRA E H, MAGDA K, SAID E S, *et al.* Promising additives to protect the activity of baculovirus biocontrol agents under field-sunlight conditions in Egypt[J]. Journal of Life Sciences, 2013, 7(5):495-500.

[11] 吕婷婷,徐兵强,阿不都克尤木.卡德尔,等. BtCry1Ab 原核表达产物与苹果蠹蛾颗粒体病毒协同增效初探[J]. 中国

生物防治学报, 2013, 29(3):469-472.

LJU T T, XU B Q, ABUDUKEYOUMU K, *et al.* The enhancement on *Cydia pomonella* granulovirus virulence by prokaryotic expressed BtCry1Ab[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2013, 29(3) :469-472. (in Chinese)

[12] 刘强,刘小芸,郑春寒,等. HearNPV 几丁质酶对 CypoGV 的协同增效作用[J]. 林业实用技术, 2010(10):31.

LIU Q, LIU X Y, ZHENG C H, *et al.* The enhancement on *Cydia pomonella* granulovirus virulence by prokaryotic expressed Chitinase of HearNPV[J]. Practical Forestry Technology, 2010(10):31. (in Chinese)

[13] 曹军,于欢,张瑞凤,等. 僵蚕提取物对棉铃虫的胃毒作用和碱性磷酸酶活性的影响[J]. 西北林学院学报, 2012, 27(3):101-104

CAO J, YU H, ZHANG R F, *et al.* The toxicity and alkaline phosphatase activity inhibition of extracts from *Bombyx batryticatus* against *Helicoverpa armigera* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2012, 27(3):101-104

[14] 张瑞凤,马贺,赵思楠,等. 僵蚕乙醇提取物对 HearNPV 的增效作用研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2014, 42(5):119-123.

ZHANG R F, MA H, ZHAO S N, *et al.* Enhancement of HearNPV by ethanol extract of bombyx batryticatus[J]. Journal of Northwest A&F University :Natural Science Edition, 2014, 42(5):119-123. (in Chinese)

[15] CARREL J E, EISNER T. Cantharidin potent feeding deterrent to insects[J]. Science, 1974(183):755-757.

[16] MATSUZAWA M, GRAZIANO M J, CASIDA J E. Endothal and cantharidin analogues:relation of structure to herbicidal activity and mammalian toxicity[J]. The Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1987, 35:823-829.

[17] KHAN R A, LIU J Y, RASHID M, *et al.* Cantharidin impedes activity of glutathione S-transferase in the midgut of *Helicoverpa armigera* Hübner[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14(3):5482-5500.

[18] RASHID A K, MARYAM R, Wang D, *et al.* Toxicology and biochemical basis of cantharidin effects on *Helicoverpa armigera* (Hub.) (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. Pakistan Journal of Zoology, 2013, 45(3):769-777.

[19] 唐翠平,乌拉,袁思安,等. 沙棘人工林早衰及其更新复壮[J]. 西北林学院学报, 2014, 30(5):47-52

TANG C P, WU L, YUAN S A, *et al.* Premature senescence and rejuvenation of *Hippophae* ssp. plantation[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2014, 30(5):47-52. (in Chinese)