

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2015.04.010

# 一种增强苹果蠹蛾颗粒体病毒田间防效方法的建立

樊江斌, 吴正伟, 刘国锋, 王 敦\*  
西北农林科技大学植保资源与害虫治理教育部重点实验室, 陕西 杨凌 712100

**摘要:**【背景】苹果蠹蛾是危害苹果和梨等蔷薇科果实的世界性重要蛀果害虫之一,目前已侵入我国新疆、甘肃、黑龙江、宁夏、内蒙古、吉林、辽宁等7省市,正在向苹果主产区扩散,严重威胁我国苹果产业的发展。欧美国家的田间应用证明,CypoGV是防治苹果蠹蛾效果最佳的生防制剂。研究开发本土CypoGV商业化制剂,对保证我国苹果业健康发展有重大意义。【方法】用室内和田间生测方法,在半人工饲料中添加被紫外线处理过的氧化铁和CypoGV-ZY混合悬液,其中氧化铁的添加浓度分别为3、5、7、10、12 mg·mL<sup>-1</sup>,并完成其对苹果蠹蛾初孵幼虫的生物测定。【结果】在病毒悬液中添加7 mg·mL<sup>-1</sup>的氧化铁能显著提高CypoGV在田间的活性和持久性,与未添加氧化铁处理相比较,初孵幼虫死亡率分别提高了53.88%和96.64%。【结论与意义】添加低剂量氧化铁,显著增强了CypoGV对田间强日光、强紫外线的适应性,提高了该病毒在田间的活性和持久性,说明氧化铁可作为商业化CypoGV制剂的助剂,提高田间CypoGV对苹果蠹蛾防治效果。本研究为我国CypoGV制剂生产过程中添加助剂提供了依据。

**关键词:** 氧化铁; UV; 生物测定; 存活率; 增效剂

## Synergic enhancement of *Cydia pomonella* granulovirus virulence using an adjuvant

Jiang-bin FAN, Zheng-wei WU, Guo-feng LIU, Dun WANG\*  
Key Laboratory of Plant Protection Resources & Pest Management of the Ministry of Education,  
Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China

**Abstract:**【Background】*Cydia pomonella* (L.) is a worldwide major fruit-boring pest of rosaceae family such as apples and pears. It has so far infested Xinjiang, Gansu, Heilongjiang, Ningxia, Inner Mongolia, Jilin, and Liaoning provinces, China. This pest is spreading towards the major apple production areas, which can result in a great threat to apple industry in China. CypoGV is considered the best biological agent to control codling moth (*C. pomonella*) in Europe and America. It is important to develop domestic CypoGV commercial agents to protect apple production in China.【Method】The virulence to neonate larvae were tested in laboratory and field bioassay using the mixtures of CypoGV-ZY with different Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> concentrations (3, 5, 7, 10, 12 mg·mL<sup>-1</sup>) treated with UV, and sunlight.【Result】The virulence and persistence of CypoGV-ZY were significant increased when mixed with 7 mg·mL<sup>-1</sup> Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in both bioassays. It also enhanced CypoGV-ZY adaptability to strong UV and sunlight. Compared to control of CypoGV-ZY, mortality rate increased 53.88% and 96.64%, in laboratory and field bioassay, respectively.【Conclusion and significance】The virulence and persistence of CypoGV-ZY were markedly enhanced by adding low dose of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, which showed that this compound was a proper candidate adjuvant for CypoGV-ZY. The results will provide the basis for commercial production of CypoGV-ZY.

**Key words:** Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; UV; bioassay; survival rate; synergistic agent

苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* (L.) 是世界范围内苹果和梨等蔷薇科果树的重要害虫之一,是我国重要的人侵生物和检疫害虫(杜磊等,2012; 努尔古丽·马坎等,2014; Garczynski *et al.*, 2011; Wearing *et al.*, 2011)。1953 年在我国新疆库尔勒首次发现苹果蠹蛾,其初孵幼虫蛀入果实内部为害直至老熟幼虫脱果,以老熟幼虫在树皮裂缝等隐蔽处越冬,对环境具有很强的适应能力(徐婧等,2012; 张学

祖,1957;周昭旭等,2008)。目前,该害虫正从西北地区(新疆、甘肃)和东北地区(黑龙江、吉林)蔓延至苹果适生区和主产区,对这些地区的苹果产量和品质构成严重威胁(张润志等,2012)。

由于化学药剂防治带来的抗药性、环境污染及农药残留问题,应用赤眼蜂 *Trichogramma chilonis* Ishii(王兰等,2011; Stef *et al.*, 2010)、斯氏科线虫 *Steinernema carpocapsae* (Weiser)(Lacey *et al.*, 2003)、苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis* (Berliner)(liu *et al.*, 2013)、苹果蠹蛾颗粒体病毒(*Cydia pomonella* granulovirus, Cypov)(Berling *et al.*, 2009; Lawrence *et al.*, 2008)等生物防治技术控制苹果蠹蛾发展迅速。在欧美等地已有10种苹果蠹蛾颗粒体病毒制剂(SAN 406、Virosoft、Carpovirusine™ evo2、Carpovirusine™ 2000、CYD-XHP、Maded™ Biocontrol、Granupom™、Carpovirusine™、Cyd-XTM、Virosoft CP4等)被登记(南宫自艳等, 2014; Lacey & Arthurs, 2005)。我国利用 Cypov 防治苹果蠹蛾研究起步较晚,目前已分离到 Cypov-ZY、Cypov-CJ01、Cypov-KS1、Cypov-KS2、Cypov-C1等本土病毒株系,并完成了室内毒力及田间防治效果试验(甘恩宇等,2011; 申建茹等,2012; liu *et al.*, 2013)。2013年 Cypov-ZY(张掖株)病毒杀虫剂制剂技术获得国家发明专利(专利号 201010013631.9)。这些研究成果为我国 Cypov 商业化生产奠定了基础。

昆虫杆状病毒进入昆虫体内后,通常需要7~10 d才能杀死寄主,添加助剂可提高其田间防效和持久性。研究证实,添加几丁质酶和 BtCry1Ab 毒素蛋白能分别缩短  $LT_{50}$  和  $LT_{90}$ (刘强等,2010; 吕婷婷等,2013);氧化铁(黑色)和增白剂能提高其他昆虫杆状病毒的紫外线耐受性(Asano, 2005; Dougherty *et al.*, 1996);添加紫外线保护剂二氧化钛和氧化锌能提高 CopyGV 对紫外线的抵抗力(Wu *et al.*, 2015)。本研究利用氧化铁作为 Cypov-ZY 在田间的保护增效剂,研究其对病毒毒力和活性的影响,为开发新型商业化 Cypov-ZY 制剂及其田间应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试虫源

苹果蠹蛾为本试验在甘肃农业大学草业学院

建立的室内种群,已连续饲养20多代。先收集虫卵,进入黑头期后用 NaClO 表面消毒,选择孵化8~12 h的幼虫为供试虫源。试虫饲养条件参数:( $25 \pm 0.5$ )℃、RH( $60 \pm 7$ )%、16 h : 8 h(L : D),幼虫取食的半人工饲料参照樊江斌等(2015)方法制备。

### 1.2 Cypov-ZY 及氧化铁

苹果蠹蛾颗粒体病毒 Cypov-ZY 由西北农林科技大学植物保护学院分子病毒学实验室保存,在甘肃农业大学草业学院扩繁并纯化,制成浓度  $1 \times 10^{10}$  OBs · mL<sup>-1</sup>, 4℃保存。氧化铁购自天津市东丽区天大化学试剂厂。

### 1.3 试验方法

微量氧化铁 15 mg · mL<sup>-1</sup> 饲喂试虫,将2 μL 该化合物添加到体积约4.5 mm<sup>3</sup>的饲料块内,待初孵幼虫取食完全后更换新饲料块。测定30头,供试幼虫均未中毒死亡,表明低剂量氧化铁对苹果蠹蛾初孵幼虫无明显毒性。因此本试验选取氧化铁浓度3~12 mg · mL<sup>-1</sup>。设置 Cypov-ZY 和蒸馏水2个对照。

1.3.1 氧化铁对 Cypov-ZY 保护增效作用的室内生测 配制  $1 \times 10^4$  OBs · mL<sup>-1</sup> 的 Cypov-ZY(Wu *et al.*, 2015)与不同浓度的氧化铁混匀液,氧化铁终浓度分别为3、5、7、10、12 mg · mL<sup>-1</sup>。病毒混合液在小培养皿中避光自然晾干,然后将其置于UVB紫外灯管(40 W)下照射4 h,再加入等体积蒸馏水。以未添加氧化铁的病毒为对照。滴加2 μL 上述病毒悬液至4.5 mm<sup>3</sup> 饲料块上,幼虫取食完饲料块后,添加新鲜饲料,逐日记录死亡和存活虫数,直至所有幼虫死亡或化蛹。参照 Eberle *et al.* (2009) 计算7 d内死亡率,按照 Abbott(1987)方法计算校正死亡率。每个处理30头幼虫,3个重复。

1.3.2 氧化铁对 Cypov-ZY 保护增效作用的田间试验 病毒强日照田间处理选择在我国日照强烈的新疆地区进行。向  $1 \times 10^6$  OBs · mL<sup>-1</sup> 的 Cypov 中添加氧化铁,制成氧化铁终浓度分别为3、5、7、10、12 mg · mL<sup>-1</sup> 的混合液。将混合液转移到培养皿中自然晾干,然后移至新疆塔里木大学苹果园中,选择强日照天气处理7 d后,用同体积蒸馏水重悬浮病毒氧化铁混合液。设置未添加氧化铁的日光处理的病毒为对照。毒力测定参照1.3.1。

### 1.4 数据分析

使用 SPSS 17.0 (SPSS Inc, USA) 进行数据分

析,采用 Duncan 氏多重比较分析不同处理间的差异显著性。采用 GraphPad Prism 5 绘图软件做图。

2 结果与分析

2.1 氧化铁对 CyptoGV-ZY 的室内保护增效作用

室内生测结果表明,添加不同浓度氧化铁的病毒经 UVB 处理 4 h 后,对苹果蠹蛾初孵幼虫的死亡率明显高于未添加氧化铁的对照组,差异极显著 ( $F_{5,12}=22.24, P<0.01$ ) (图 1A)。当氧化铁浓度为

7 mg · mL<sup>-1</sup>时,幼虫死亡率最高 (70.77%),与氧化铁浓度 5 mg · mL<sup>-1</sup>相比,幼虫死亡率差异不显著 ( $P>0.05$ ),但比未添加病毒的处理增加了 53.88%。UVB 照射病毒后幼虫存活率 53.33% (图 1B),添加 5 mg · mL<sup>-1</sup>氧化铁后再被 UVB 照射,幼虫存活率降至 33.33%,而未被 UVB 照射的对照组幼虫存活率仅为 13.33%,表明低剂量氧化铁能帮助病毒抵抗 UVB 伤害,进而提高其对宿主昆虫的毒力。

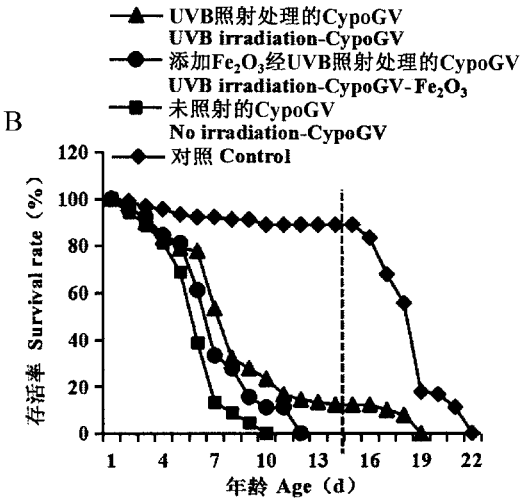
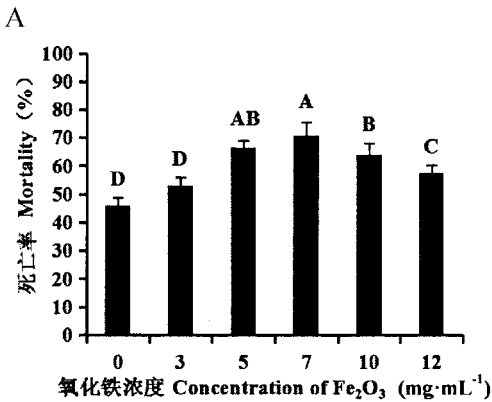


图 1 不同浓度氧化铁对 CyptoGV-ZY 的增效作用(室内)

Fig.1 The enhancement on *Cydia pomonella* granulovirus virulence at different concentrations of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> under laboratory conditions  
A:柱状图上的不同大写字母表示经 Duncan 氏多重比较在 0.01 水平上差异显著。B:氧化铁(5 mg · mL<sup>-1</sup>)作为 CyptoGV (1×10<sup>4</sup> OBs · mL<sup>-1</sup>)的 UVB 保护剂对初孵幼虫存活率的影响,对照处理的幼虫 88.89%在孵化后 15 d 开始化蛹。  
A: Different capital letters in the bar graph represent significant differences at 0.01 levels using a Duncan's multiple ranging test.  
B: The effects on survival rate of neonate larvae infested with CyptoGV-ZY (1×10<sup>4</sup> OBs · mL<sup>-1</sup>) using Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(5 mg · mL<sup>-1</sup>) as UVB protective agent and approximately 88.89% larvae pupated in control.

2.2 氧化铁对 CyptoGV-ZY 的田间保护增效作用

昆虫病毒制剂在田间应用过程中,强紫外线容易杀死病毒,减弱病毒制剂在田间的防治效果。图 2 表明添加氧化铁的病毒经强日照处理,对苹果蠹蛾初孵幼虫的死亡率明显高于未添加氧化铁的对照组,并随着氧化铁浓度增加,差异极显著 ( $F_{5,12}=36.23, P<0.01$ ),表明添加氧化铁能提高病毒对强日照环境的抵抗力及田间持久性。向 CyptoGV-ZY 添加氧化铁终浓度 7 mg · mL<sup>-1</sup>,初孵幼虫死亡率 70.77%,比对照提高了 96.64%。

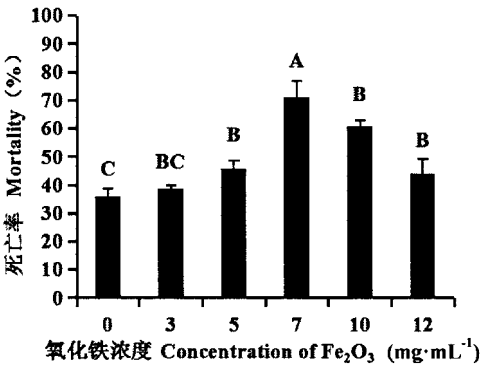


图 2 不同浓度氧化铁对 CyptoGV-ZY 的增效作用(田间)

Fig.2 The enhancement on *Cydia pomonella* granulovirus virulence at different concentrations of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> under field essay  
柱状图上的不同大写字母表示经 Duncan 氏多重比较在 0.01 水平上差异显著。  
Different capital letters in the bar graph represent significant differences at 0.01 levels using a Duncan's multiple ranging test.

3 讨论

昆虫杆状病毒具有寄主专化性和非靶标生物安全的特点,目前被广泛应用于害虫防治。但病毒离开活体寄主,其活性在外界环境中受到多种非生物因子的影响。

紫外线(UV)是一种严重影响核型多角体病毒(Nucleopolyhedrovirus, NPV)和颗粒体病毒(Granulosis virus, GV)活性和持久性的非生物因素之一。通过添加吸收剂和反射剂等紫外线保护剂,能够阻止 UV 到达病毒体上,减弱 UV 对病毒造成的伤害(Wu *et al.*, 2015)。Jaques(1971)验证了 29 种物质都可作为粉纹夜蛾核型多角体病毒的 UV 保护剂。

室内研究表明,UV 造成 Cypovirus 失活是一个双峰曲线,大部分(约 99%)病毒很快失去活性,而少部分表现为持久活性(Huber & Luedcke, 1996)。二氧化钛和氧化铁能增强 *Helicoverpa zea* NPV 及 *Homona magnanima* GV 在 UV 下的稳定性,从而提高病毒活性和持久性(Asano, 2005; Farrar *et al.*, 2003)。病毒生测试验结果证明,UV 处理时添加 1~4 mg · mL<sup>-1</sup>氧化铁,能够减少 1/6~1/18 的病毒失活(Asano, 2005)。本研究中,未添加氧化铁保护剂的 Cypovirus 被 UVB 照射后,幼虫存活率 53.33%,而添加 5 mg · mL<sup>-1</sup>氧化铁的 Cypovirus, UVB 再处理时,幼虫存活率降低至 33.33%。田间应用表明,喷雾 3 d 后 Cypovirus 感染活性减半,而在 4~8 周后部分 Cypovirus 仍持有感染活性(Glen & Payne, 1984)。添加木质素、二氧化钛和蔗糖的 Cypovirus 制剂比商业化添加甘油的 Cypovirus 制剂(Cyd-X),能够保护病毒免受紫外线伤害,使苹果蠹蛾的死亡率提高 26%~27%(Arthurs *et al.*, 2006)。本研究通过室内和田间生测,表明添加氧化铁可提高 Cypovirus 对 UVB 抵抗力。随着氧化铁浓度增加,幼虫死亡率先升后降,可能是因为高浓度氧化铁影响病毒入侵昆虫中肠细胞。当氧化铁浓度为 7 mg · mL<sup>-1</sup>时,显著增强了 Cypovirus 的活性和持久性;初孵幼虫存活率曲线也证明氧化铁对 Cypovirus 具有保护作用,它能减弱 UV 对病毒的损害,提高 Cypovirus 的防治效果。研究表明,氧化铁可作为 Cypovirus 的添加剂,增强 Cypovirus 对苹果蠹蛾的田间防治效果,这为我国 Cypovirus 制剂本土化生产提供了依据。

参考文献

杜磊, 刘伟, 柴绍忠, 杨建强, 张润志. 2012. 苹果蠹蛾的蛀果与脱果特性. 应用昆虫学报, 49(1): 61-69.

樊江斌, 吴正伟, 尚素琴, 艾克然木·米吉提, 张雅林, 王敦. 2015. 苹果蠹蛾半人工饲料与饲养温度的优化. 植物保护学报, 42(1): 45-50.

甘恩宇, 李晓峰, 于欢, 吴正伟, 徐利, 张雅林, 王敦. 2011. 3 株苹果蠹蛾颗粒体病毒本土株的毒力测定与田间防效. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 39(10): 119-122, 133.

刘强, 刘小芸, 郑春寒, 吕婷婷, 项林平, 王敦. 2010. He-arNPV 几丁质酶对 Cypovirus 的协同增效作用. 林业实用技术, (10): 31.

吕婷婷, 徐兵强, 阿不都克尤木·卡德尔, 王敦. 2013. Bt-Cry1Ab 原核表达产物与苹果蠹蛾颗粒体病毒协同增效初探. 中国生物防治学报, 29(3): 469-472.

南宫自艳, 宋萍, 王永娟, 王勤英. 2014. 苹果蠹蛾生物防治技术的研究和应用进展. 中国生物防治学报, 30(2): 260-265.

努尔古丽·马坎, 岳朝阳, 克热曼, 张新平, 刘爱华, 阿里木·买买提, 焦淑萍. 2014. 苹果蠹蛾对新疆林果业发展影响的评估及风险管理, 42(6): 126-132.

申建茹, 刘万学, 万方浩, 张芬琴. 2012. 苹果蠹蛾颗粒体病毒 CpGV-CJ01 的分离和鉴定. 应用昆虫学报, 49(1): 96-103.

王兰, 冯宏祖, 郭文超, 张辉, 杨力, 许建军. 2011. 苹果蠹蛾消长动态及果园中赤眼蜂释放技术的研究. 新疆农业科学, 48(2): 261-265.

徐婧, 姜红霞, 阿丽亚, 郭静敏, 张润志. 2012. 甘肃、新疆、内蒙苹果蠹蛾成虫消长规律. 应用昆虫学报, 49(1): 89-95.

张润志, 王福祥, 张雅林, 陈汉杰, 罗进仓, 王勤英, 刘万学, 艾尼瓦尔·木沙, 蒲崇建, 等. 2012. 入侵生物苹果蠹蛾监测与防控技术研究——公益性行业(农业)科研专项(200903042)进展. 应用昆虫学报, 49(1): 37-42.

张学祖. 1957. 苹果蠹蛾(*Carpocapsa pomonella* L.)在我国的新发现. 昆虫学报, 7(4): 467-472.

周昭旭, 罗进仓, 陈明. 2008. 苹果蠹蛾的生物学特性及消长动态. 植物保护, 34(4): 111-114.

Abbott W S. 1987. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 3: 302-303.

Arthurs S P, Lacey L A and Behle R W. 2006. Evaluation of spray-dried lignin-based formulations and adjuvants as solar protectants for the granulovirus of the codling moth, *Cydia pomonella* (L). *Journal of Invertebrate Pathology*, 93: 88-95.

Asano S. 2005. Ultraviolet protection of a granulovirus product using iron oxide. *Applied Entomology and Zoology*, 40: 359-364.

Berling M, Blachere-Lopez C, Soubabere O, Lery X, Bonhomme A, Sauphanor B and Lopez-Ferber M. 2009. *Cydia pomonella* granulovirus genotypes overcome virus resistance in the codling moth and improve virus efficiency by selection against resistant hosts. *Applied and Environmental Microbiology*



- gy, 75: 925–930.
- Dougherty E M, Guthrie K P and Shapiro M. 1996. Optical brighteners provide baculovirus activity enhancement and UV radiation protection. *Biological Control*, 7: 71–74.
- Eberle K E, Sayed S, Rezapanah M, Shojai-Estabragh S and Jehle J A. 2009. Diversity and evolution of the *Cydia pomonella* granulovirus. *Journal of General Virology*, 90: 662–671.
- Farrar J R R, Shapiro M and Javaid I. 2003. Photostabilized titanium dioxide and a fluorescent brightener as adjuvants for a nucleopolyhedrovirus. *Biocontrol*, 48: 543–560.
- Garczynski S F, Unruh T R, Guédot C and Neven L G. 2011. Characterization of three transcripts encoding small heat shock proteins expressed in the codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Insect Science*, 18: 473–483.
- Glen D M and Payne C C. 1984. Production and field evaluation of codling moth granulosis virus for control of *Cydia pomonella* in the United Kingdom. *Annals of Applied Biology*, 104: 87–98.
- Huber J and Luedcke C. 1996. UV-Inactivation of baculoviruses: the bisegmented survival curve. *IOBC/WPRS Bull*, 19: 253–256.
- Jaques R P. 1971. Tests on protectants for foliar deposits of a polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 17: 9–16.
- Lacey L A and Arthurs S P. 2005. New method for testing solar sensitivity of commercial formulations of the granulovirus of codling moth (*Cydia pomonella*, Tortricidae: Lepidoptera). *Journal of Invertebrate Pathology*, 90: 85–90.
- Lacey L A, Unruh T R and Headrick H L. 2003. Interactions of two idiobiont parasitoids (Hymenoptera: Ichneumonidae) of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) with the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* (Rhabditi-da: Steinernematidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 83: 230–239.
- Lawrence L, Donald T, Charles V and Steven A. 2008. Codling moth granulovirus: a comprehensive review. *Biocontrol Science and Technology*, 18: 639–663.
- Liu X Y, Lei C F and Sun X L. 2013. Control efficacy of *Bacillus thuringiensis* and a new granulovirus isolate against *Cydia pomonella* in orchards. *Biocontrol Science and Technology*, 23: 691–700.
- Stef R, Grozea I, Simeria G, Carabet A F, Levente M, Vîrteiu A N and Damianov S. 2010. The effectiveness of *Trichotim* in control of *Cydia pomonella* L. in western Romania. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 75: 417–422.
- Wearing C H, Attfield B A, Colhoun K and Marshal R R. 2011. Codling moth, *Cydia pomonella* L., colonisation of a newly-planted organic pome fruit orchard in Central Otago, New Zealand, and methods of pest management over the first ten years. *Crop Protection*, 40: 105–113.
- Wu Z W, Fan J B, Yu H, Wang D and Zhang Y L. 2015. Ultraviolet protection of the *Cydia pomonella* granulovirus using zinc oxide and titanium dioxide. *Biocontrol Science and Technology*, 25: 97–107.

(责任编辑:郭莹)

