

文山松毛虫质型多角体病毒杀虫剂的研制

彭辉银¹, 周显明², 沈瑞菊³, 陈世维⁴,
刘家欣¹, 陈新文¹, 杨春华², 谢天恩¹

S767.32

S476.13

¹(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)²(贵州省林业科学研究院, 贵阳 550011)³(武汉市卫生防疫站, 武汉 430032)⁴(云南省林业科学研究院森林保护研究所, 昆明 650000)

摘要:报道了文山松毛虫质型多角体病毒杀虫剂的研制, 包括多角体的纯化、辅助剂的筛选、剂型研制、产品包装以及病毒杀虫剂的产品质量检测及生产等。该杀虫剂为乳剂, 多角体浓度达 2.5×10^9 PIB/mL; 所选辅助剂取材方便、容易配制, 对环境没有污染。经安全检测证明, 无致病菌, 符合国家卫生标准, 对试验动物小白鼠无毒性和致病性。生物测定用 1×10^6 PIB/mL 感染 2 龄文山松毛虫幼虫, 其死亡率平均为 85.5%。

关键词:文山松毛虫质型多角体病毒; 杀虫剂; 林业; 制剂 生物防治

中图分类号: S482.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2000)02-0149-07

文山松毛虫 (*Dendrolimus punctatus wenshanensis*) 属鳞翅目, 枯叶蛾科。分布在云南(文山、红河、昆明等地)、贵州(兴义、望谟、盘县等地), 是林业的一种重要害虫^[1-3]。松毛虫(其中包括马尾松毛虫、云南松毛虫、赤松毛虫、文山松毛虫等)是中国林业的一种重要害虫, 每年危害面积达 800 万公顷, 给林业生产和环境带来了极大的危害。仅湖北省一年就有 15 万公顷松林被马尾松毛虫危害, 湖南、四川等省受云南松毛虫的危害十分严重。广东、广西、福建等省主要受马尾松毛虫的危害。我们从 1991 年开始进行松毛虫病毒杀虫剂的研制, 经过多年努力, 取得了良好的效果。现将试验结果报道如下:

1 材料与方 法

1.1 材 料

文山松毛虫质型多角体病毒病死虫尸由云南省林科院提供^[4]。

文山松毛虫质型多角体病毒杀虫剂(简称 DpwCPV-HL)由中国科学院武汉病毒研究所病毒室提供, 多角体含量为 2.5×10^9 PIB/mL。实验用纯系昆明小白鼠由中国科学院武汉病毒研究所实验动物饲养中心提供。

1.2 方 法

1.2.1 差速离心提取多角体

收稿日期: 1999-06-04, 修回日期: 1999-07-19

作者简介: 彭辉银(1950年-), 男, 湖北秭归人。研究员。主要从事昆虫病毒资源的调查、病毒的分离鉴定、病毒杀虫剂的生产及应用研究。

将病死虫尸加适量无菌水置高速组织匀浆器皿中匀浆 3 min, 取出按 1:10 加蒸馏水, 先用低速 (500 r/min) 离心 3 min, 除去沉淀和细胞组织碎片, 取上清液再用高速 (3 500 r/min) 离心 30 min, 收集沉淀用蒸馏水悬浮, 重复交替使用上述方法 2~3 次, 得较纯净的 DpwCPV 多角体置冰箱保存备用。

1.2.2 DpwCPV 多角体的计数

准确称取湿重 1.0 g 提纯的多角体, 以蒸馏水稀释成 10 mL, 然后按 10 倍梯度依次稀释成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} , 充分摇匀。用移液管吸取配制好的悬液置预先准备的血球计数板上, 静止 2~3 min 后, 置光学显微镜下计数, 采用五点取样法, 以每个大格中多角体数目不超过 30 个为宜 (比较不同的稀释度), 重复 3 次, 取其平均值, 所得结果按下述公式计算:

$$\text{多角体浓度 (PIB/mL)} = \text{五大格的多角体数} \times 5 \times 10^4 \times \text{稀释倍数}$$

1.2.3 辅助剂的筛选

筛选经济、取材方便、便于运输, 在常温下保存三年不影响病毒活性的辅助剂。文山松毛虫质型多角体病毒杀虫剂主要为乳悬剂。

1.2.4 DpwCPV-HL 制剂的产品质量检测 and 安全性试验^[5~7]

将 DpwCPV-HL 制剂进行产品活性测定和安全性检测, 对病毒原生物活性与制成产品后的生物活性进行比较, 按常规毒力测定方法进行。同时, 根据国际标准 (FB4789、1-4789、24-48) 对所研制的产品进行病原微生物的检测, 检测的主要对象是沙门氏菌、志贺氏菌、大肠杆菌和细菌总数等八项指标。经检验合格后, 再进行实验动物的急性试验, 以保证产品的安全性和稳定性, 按照 Horn 氏方法进行^[3]。

1.2.5 微生物检验

按我国卫生防疫细菌检验方法进行逐项检查^[7]。

1.2.5.1 杂菌总数检测 取 DpwCPV-HL 制剂 1 mL 注入无菌平皿中, 同时取制剂 1 mL 作 10^{-1} ~ 10^{-9} 稀释, 取各稀释液 1 mL 分别注入无菌平皿中, 再加入事先活化并冷至 45 °C 细菌培养基, 摇匀, 待冷却后放入 37 °C 恒温箱培养 24 h, 取出作菌落计数。

1.2.5.2 大肠杆菌群检测 用无菌吸液管吸取病毒制剂 1、0.1、0.01、0.001 mL 分别接种到 4 支单倍乳糖发酵管中, 经 37 °C 培养 18~24 h, 若有产酸产气管则转接伊红美兰平板, 挑选可疑菌落做重复发酵试验, 乳糖管不产酸不产气者即为大肠杆菌群阴性。

1.2.6 致病菌检测 取病毒制剂 5 mL 加无菌水 495 mL, 加化学沉淀剂, 充分摇匀, 静置 60 min, 将上清液倒入另一无菌瓶中备用, 取沉淀直接做下列菌的分离, 按常规法作进一步鉴定。

1.2.6.1 志贺氏菌 直接分离法: 取 0.1 mL 沉淀直接用 SS 平板分离。增菌培养: 取病毒制剂 0.5 mL 接种 10 mL 单倍 9N 增菌液, 再取病毒稀释液 100 mL, 接种 100 mL 双倍 GN 增菌液, 将上述二种培养液置 37 °C 恒温培养箱中培养 6~8 h 后, 用 SS 和 HE 平板进行分离。

1.2.6.2 沙门氏菌 检验沙门氏菌需先接种选择性不同的增菌培养基。取病毒制剂 0.5 mL 接种于单倍 SEM 增菌液中, 在 37 °C 恒温箱中培养 18~24 h 后用 SS 和 HE 平板分离。另取前述病毒制剂稀释液 100 mL 注入双倍 SEN 增菌液, 置 37 °C 恒温培养箱中培养 18~24 h, 再经 SS、WS 及麦康凯平板分离。

1.2.6.3 耶尔森氏菌 取沉淀 0.5 mL 直接用麦康凯平板分离, 置 25 °C 培养 48 h。

1.2.6.4 弯肠弯曲菌 取沉淀 0.1 mL 直接用布氏平板分离, 置 42 °C 培养 48 h。

1.2.6.5 弧菌 取病毒制剂 0.5 mL 接种于 10 mL 单倍硷胨水, 另取前述病毒制剂稀释液 100 mL 接种二倍硷胨水。然后分别装入 37 °C 恒温箱中培养 12 h 后转接大平板分离。

1.2.6.6 化脓性球菌 取沉淀 0.1 mL 直接用皿平板分离, 另取沉淀 1 mL 接种 10 mL 却浦曼增菌液置 37 °C 恒温培养箱中培养 22~24 h 后转接却浦曼平板。

1.2.6.7 炭疽杆菌 取沉淀 0.1 mL 直接用平板分离。

1.2.6.8 厌氧菌 取沉淀 1 mL 接种肉培养基增菌 48 h 后转接皿平板作厌氧培养。

1.2.7 动物急性毒性实验

动物急性毒性实验参照陈尔厚等^[4]方法进行,分为口服、灌胃、腹腔注射共三个处理,每个处理设实验 2 组和对照组 2 组,每组 10 只纯系昆明小白鼠,雌雄各 5 只,每只重 18~20 g。

1.2.7.1 口服组

取 1:100 倍 DpwCPV-HL 制剂稀释液 1.6 mL(每只用量 0.32 mL),均匀拌入 5 粒固体饲料上,分别让 5 只小白鼠自然取食,隔日一次,吃完后再添加新鲜饲料。连续饲喂一周。其接种剂量按体重计为 4×10^8 PIB/kg,相当大田使用浓度的 160 倍。口服对照组用不含 DpwCPV-HL 制剂的辅助剂作同样处理。

1.2.7.2 腹腔注射组 取 DpwCPV-HL 制剂稀释液 0.32 mL(约 2×10^6 PIB)分别给小白鼠作腹腔注射,隔日一次,共 4 次,总有效剂量为 4×10^8 PIB/kg 体重·只。腹腔注射对照组用不含 DpwCPV-HL 制剂的辅助剂作同样处理。

1.2.7.3 灌胃组 取 DpwCPV-HL 制剂稀释液 0.32 mL(2×10^6 PIB)分别给每只小白鼠作灌胃,隔日一次,共 4 次,有效剂量为 4×10^8 PIB/kg 体重·只。灌胃对照组用不含 DpwCPV-HL 制剂辅助剂作同样处理。

2 结果与讨论

2.1 DpwCPV 多角体计数

经纯化的多角体含量为 5×10^9 PIB/mL。

2.2 DpwCPV-HL 制剂辅助剂的选择

有效成分为:湿润剂有茶枯粉、中性肥皂粉;乳化剂有 656H、656L;保护剂有荧光素、荧光素钠、黄连素、甘油等佐剂,经过严格的筛选,对每一种成分都进行毒性试验。结果表明,上述所加佐剂对被测试幼虫均无不良的影响,其死亡率在 2.8%~12% 之间,与对照无明显差异(5.4%),详见表 1。

表 1 DpwCPV-HL 制剂的辅助剂对松毛虫的毒力测定

Table 1 Selection of assistant agent for the DpwCPV-HL viral insecticide

辅助剂名称 Name of assistant agent for insecticide	供试含量(%) Dose	供试虫数(头)* Tested larvae	死虫数(头) Died larvae	死亡率(%) Mortality
中性肥皂粉 Neutral soap	0.3	37	3	8.1
茶枯粉 Tea seed power	2.0	34	4	12.0
656H	0.3	37	4	2.9
656L	0.3	34	1	5.4
荧光素钠 Sodium fluorescein	0.02	35	2	5.7
黄连素 Berberine	0.02	35	3	8.7
甘油 Glycerin	10.0	35	1	2.8
CK	0.0	37	2	5.4

* 二龄幼虫 Second instar

DpwCPV-HL 制剂所用辅助剂选用 656H 乳化剂、光保护剂和病毒保护剂为基础材料,另加非极性佐剂制成油乳剂。其方法简洁、经济、有效,既可用于常规喷雾,又可用于超低容量喷雾;它能以任何比例与水混合,不沉淀、不堵塞喷头、无毒、无臭,使用安全,运输方便。

2.3 剂型研制工艺

2.3.1 剂型配制

将提纯的多角体经血球计数板在光学显微镜下计数后,准确称取其多角体的重量(以克为单位),按每毫升 25 亿多角体进行配制;配制时按比例计算所需水、光保护剂、乳化剂、及佐剂

的量,然后按先后顺序依次将各种佐剂和水徐徐加入,在电动搅拌机中搅拌使其混合均匀,搅拌时应尽量避免产生气泡或泡沫,以免影响灌封机操作。

2.3.2 剂型包装

DpwCPV-HL 制剂为一种水溶性的油乳剂,采用上海制药机械厂生产的 LSAG5/10 I 型单针头机械式安瓿拉丝灌封机进行灌封,每毫升含有有效成分(多角体)20 亿,每安瓿装 5 mL (详见图 1)。

2.4 产品毒力测定

用 2 龄马尾松毛虫幼虫为供试昆虫,每组 30 头,重复三次,将 DpwCPV-HL 制剂稀释成 1×10^6 PIB/mL 感染浓度添食松毛虫幼虫,在温度 23~25 °C。湿度 80~85% 的情况下,接毒 12 d 后,幼虫死亡率高达 90.2%,最低 71%,平均达 85.5%。表达 DpwCPV-HL 制剂对马尾松毛虫具有较高的毒性和致病性^[4]。

2.5 DpwCPV-HL 剂制对动物安全性检测

2.5.1 动物急性毒性试验

动物急性毒性试验结果见表 2。

表 2 DpwCPV-HL 制剂对小白鼠的毒性试验
Table 2 Toxicity test to mice with DpwCPV-HL viral insecticides

接种途径 Inoculation ways	接种剂量 Inoculated dose PIB/kg	试验动物 数量(只) Trial number	动物 animal	供试 天数 (天) Trial days	外表病症 ^a :呼吸,皮 肤,脱毛,死亡 Character of Outside body (Breache, skin, lose hair death)	^b 解剖内脏,心,肺,脾, 胃等的变化 Character of inside Body (Heart, lung, Spleen and stomach)
口服组 Oral	4×10^8 PIB/kg (CK)	♀	5	14	无异常	无异常
		♂	5		Normal	Normal
		♀	5	14	无异常	无异常
		♂	5		Normal	Normal
腹腔注射 Abdominal	4×10^8 PIB/kg (CK)	♀	5	14	无异常	无异常
		♂	5		Normal	Normal
		♀	5	14	无异常	无异常
		♂	5		Normal	Normal
胃组 stomach	4×10^8 PIB/kg CK	♀	5	14	无异常	无异常
		♂	5		Normal	Normal
		♀	5	14	无异常	无异常
		♂	5		Normal	Normal

a 外表病症:呼吸、皮肤、脱毛和死亡变化 Characteristics of outside body: breathe, skin, lose hair deaths, etc.

b 解剖心、肺、脾和胃,观察其病理变化 Characteristics of inside body: heart, lung, spleen, stomach, etc.

2.5.2 病原微生物检测

按照我国卫生防疫细菌检验方法进行检验^[7],结果详见表 3。

2.6 DpwCPV-HL 剂制防治松毛虫的田间试验

1993 年 5 月在宁乡灰塘林场,选择林分适中、虫情中等、树高 3~5 米的马尾松林地进行野外田间试验。设置 3 个处理:A)松毛虫赤眼蜂($18 \sim 22.5$ 万头/ hm^2);B)松毛虫赤眼蜂携带病毒($18 \sim 22.5$ 万头 + DpwCPV 2.75×10^{10} PIB/ hm^2);C)DpwCPV-HL 病毒制剂(2.75×10^{10} PIB/ hm^2);1994 年 5 月在长沙浏阳林场进行大田试验,除上述处理外,增加一项化学农药试验(Decise 375 ml/ hm^2)。放蜂前和放蜂后均做虫口基数调查。处理后分别于 5 d、10 d、15 d 调查

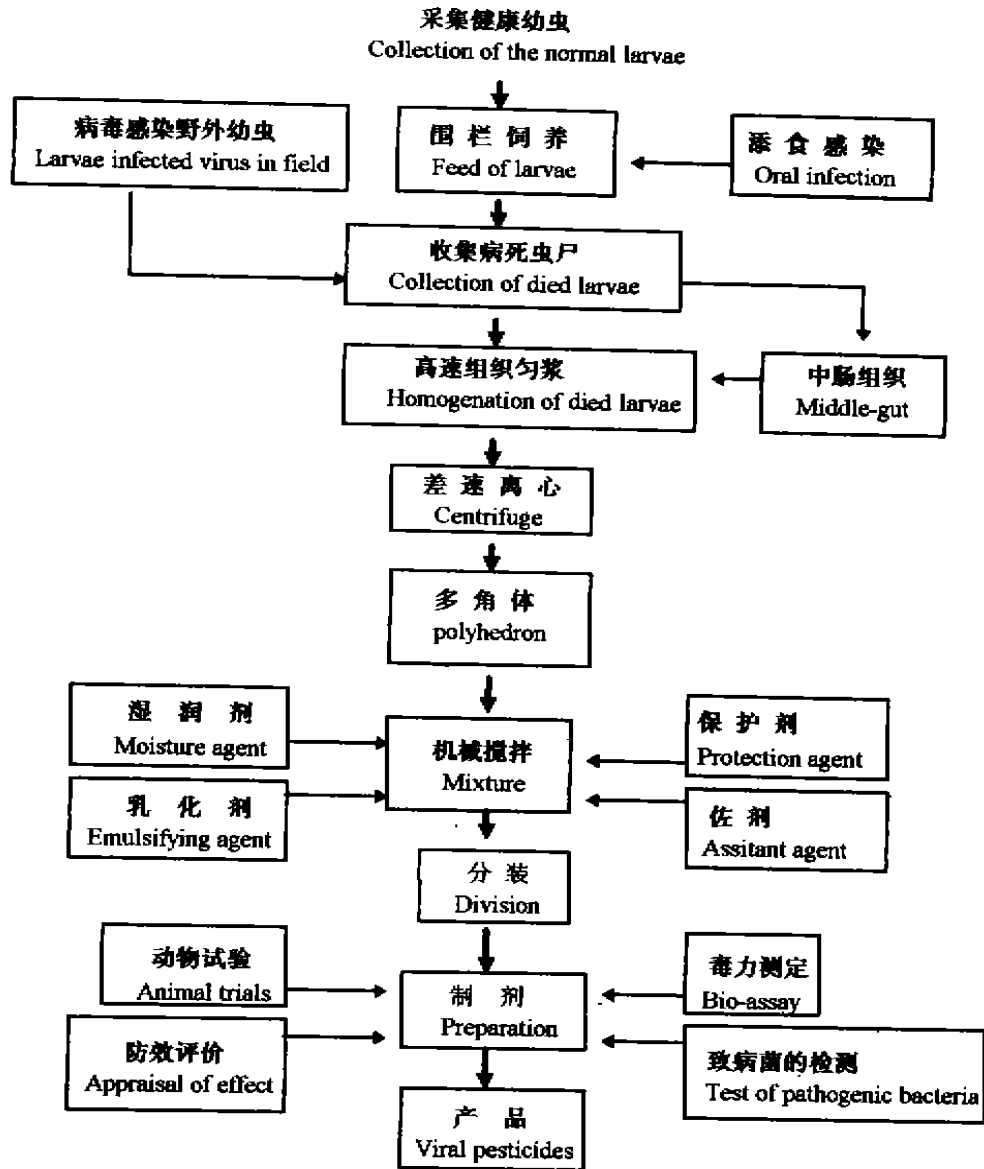


图 1. 病毒制剂的生产工艺示意图

Fig. Production technology of viral insecticide

图 1 病毒制剂的生产工艺示意图

Fig. 1 Production technology of viral insecticide

现有活虫数,计算虫口下降率。累计调查结果见表 4。

由表 4 可知,单用松毛虫赤眼蜂防治马尾松毛虫调查效果为 45.3%~86.8%,平均为 66.08%,与张帆等(私人通讯 1995)试验结果一致。而松毛虫赤眼蜂携带病毒防治效果为 87.78%~

表3 三种病毒制剂的微生物学检测结果比较

Table 3 Comparison of disease organism examination with three viral insecticides

杀虫剂种类 Sorts of pesticide	细菌总数 (个/ml) Bacterial/ mL	检测项目 Detecting items								
		大肠杆菌 <i>E. coli</i>	沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	志贺氏菌 <i>Shigella</i>	弯肠弯曲菌 <i>Campylobacter jejuni</i>	耶尔森氏菌 <i>Yersinia enterocolitica</i>	炭疽杆菌 <i>Bacillus anthracis</i>	厌氧菌 <i>Anaerobacteria</i>	化脓性球菌 <i>Staphylococcus</i>	弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
BsNPV-90-HL*	1.2×10^6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TM-Bio-control-1	$10^7 - 10^9$	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DpwCPV-HL	4.5×10^4	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* 油桐尺蠖病毒杀虫剂, BsNPV viral insecticides; ** 午毒蛾病毒杀虫剂, LdMNPV viral insecticides

表4 DpwCPV-HL 制剂防治松毛虫田间试验结果

Table 4 The test results of DpwCPV-HL viral insecticide controlling the pest in the field

供试地点 Place of trials	供试项目 Contents	试验面积 Trial area (hm ²)	虫口基数 Insects	防治效果 Mortality(%)
宁乡林场 Linxiang Forestry Farm	寄生蜂 (<i>Trichogramma M.</i>)	0.33	165	45.37
	寄生蜂 + 病毒 (<i>Trichogramma M.</i> + CPV)	0.33	600	87.78
	病毒(CPV)*	2.00	345	99.50
长沙林场 Changsha Forestry Farm	寄生蜂 (<i>Trichogramma M.</i>)	1.00	150	86.80
	寄生蜂 + 病毒 (<i>Trichogramma M.</i> + CPV)	0.67	150	95.20
	病毒(CPV)*	1.00	105	96.00
应城市 团山林场 Yinchen Forestry Farm	化学农药(Decise)*	0.67	90	99.10
	寄生蜂 + 病毒 (<i>Trichogramma M.</i> + CPV)	100	139	91.00

* 注:置初孵幼虫期使用病毒和化学农药的结果

The results of using viral insecticide and chemical for the lower instar larvae.

95.20%, 平均为 91.50%。

综上所述, DpwCPV-HL 制剂的研制、多角体的纯化、辅助剂的筛选、剂型加工、产品包装以及产品质量检测等均取得了良好的效果。该制剂性能稳定, 所选辅助剂符合配制杀虫剂的要求, 对环境不会造成任何污染; 产品经武汉市卫生防疫站进行的安全检测, 符合国家卫生标准, 无任何致病菌; 生物测定结果表明, 用 1×10^6 PIB/mL 感染 2 龄马尾松毛虫幼虫, 其死亡率平均为 85.5%; 对试验动物无任何致病性和毒性。在该制剂中不含有任何致病菌, 对人畜安全无害。

参 考 文 献

- [1] 林业部南方植物检疫所编. 防治棉毛虫专辑[C]. 北京: 中国林业出版社, 1983. 3~8
- [2] 林业部南方植物检疫所编. 防治棉毛虫专辑[C]. 北京: 中国林业出版社, 1983. 9~16
- [3] 林业部南方植物检疫所编. 防治棉毛虫专辑[C]. 北京: 中国林业出版社, 1983. 24~34

- [4] 陈尔厚,陈杨维,段兆尧,等.文山松毛虫质型多角体病毒生物活性测定[J].云南农业科技,1987,1:54-57
- [5] Martin Shapiro, In: Kurstak, E M ed. Microbial and Viral Pesticides [C]. New York: Marcel Dekker, Inc. 1982.483-484
- [6] 祝庆基,刘军.油桐尺蠖核型多角体病毒对实验动物的毒性试验[J].中国茶叶,1982,4:30-32
- [7] 高树德,汪美先主编.防疫检验手册[C].北京:人民卫生出版社,1981.22-85

Development of *Dendrolimus punctatus wenshanensis* Cytoplasm Polyhedrosis virus (DpwCPV) Insecticide

PENG Hui-yin¹, ZHOU Xian-min², SHENG Rui-ju³, CHEN Shi-wei⁴,
LIU Jia-xin¹, CHEN Xin-wen¹, YANG Chun-hua², XIE Tian-en¹

¹(Wuhan Institute of Virology, CAS, Wuhan 430071, China)

²(Guizhou Province Forest Academy of Sciences, Guiyan 550011, China)

³(Wuhan Health Control Station, Hankou 430022, China)

⁴(Yunnan Province Forest Academy of Sciences, Kunming 650000, China)

Abstract: The development of *Dendrolimus punctatus wenshanensis* Cytoplasm Polyhedrosis Virus (DpwCPV) insecticide is reported. The formulation is an oil-in-water emulsion and the concentration of polyhedrosis is 2.5×10^9 PIB/mL. The auxiliary materials come from the agriculture products. It is safety and the viral insecticide contained no any pathogenic bacteria. The average mortality is 85.5% when the second instar larvae were infected by 10^6 PIB/mL DpwCPV.

Key words: *Dendrolimus punctatus wenshanensis* Cytoplasm Polyhedrosis Virus (DpwCPV); Viral insecticide; Forestry; Formulation