

徐 健, 李传明, 韩光杰, 等. 颗粒体病毒(CnmeGV)对稻纵卷叶螟的感染及害虫种群增长的影响[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(1): 29-33.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.01.004

颗粒体病毒(CnmeGV)对稻纵卷叶螟的感染及害虫种群增长的影响

徐 健¹, 李传明¹, 韩光杰¹, 徐 彬¹, 祁建杭², 孙 俊², 刘 琴¹

(1. 江苏里下河地区农业科学研究所, 江苏 扬州 225007; 2. 扬州绿源生物化工有限公司, 江苏 扬州 225008)

摘要: CnmeGV 是侵染稻纵卷叶螟的专性杆状病毒。本研究旨在明确田间条件下 CnmeGV 对稻纵卷叶螟的侵染及种群增长的影响。结果表明, 在田间条件下, CnmeGV 对稻纵卷叶螟具有较强的致病性, 7.500×10^5 OB/m² 和 1.125×10^6 OB/m² 田间喷洒 24 d 后, 害虫感病显症幼虫比例达 69.16%~70.77%。感染病毒幼虫威布尔频数分布拟合存活率曲线表现为死亡率是年龄的增函数, 死亡主要发生在幼虫中后期的感病个体中, 不同浓度致死中时间为 20.16~21.98 d。种群生命表参数表明 CnmeGV 对稻纵卷叶螟种群具有明显的干扰控制作用, 不同浓度病毒处理区的种群控制指数(IPC)为 0.31~0.32。CnmeGV 对稻纵卷叶螟具有致病力强, 感病幼虫死亡周期长的特点, 田间应用 CnmeGV 可以显著降低害虫种群增长趋势指数, 有效抑制稻纵卷叶螟种群增长。

关键词: 稻纵卷叶螟; 颗粒体病毒; 病毒侵染; 种群调控

中图分类号: S476⁺.13

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2018)01-0029-05

The effect of *Cnaphalocrocis medinalis* granulovirus (CnmeGV) on larva infection and population regulation of rice leaffolder

XU Jian¹, LI Chuan-ming¹, HAN Guang-jie¹, XU Bin¹, QI Jian-hang², SUN Jun², LIU Qin¹

(1. Institute of Agricultural Science of the LiXiahe District in Jiangsu Province, Yangzhou 225007, China; 2. Yangzhou Luyuan Bio-chemical Co. Ltd., Yangzhou 225008, China)

Abstract: CnmeGV is a specialized baculovirus and can infect the larvae of rice leaffolder [*Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée)]. The purpose of this paper was to explore the effect of CnmeGV on larvae infection and population regulation of rice leaffolder in rice paddy. CnmeGV had great pathogenicity to the larvae of rice leaffolder in the field. After spraying CnmeGV for 24 days at the concentrations of 7.500×10^5 OB/m² and 1.125×10^6 OB/m², larva infective rates ranged from 69.16% to 70.77%. Survival rate curve of infected larva fitted with the model of Weibull frequency was an increasing function of mortality-age, larvae mortality mainly happened in middle and late period. Median lethal time ranged from 20.16 d to 21.98 d at different concentrations. Parameters from life table of natural population indicated that

收稿日期: 2017-07-28

基金项目: 江苏省“六大人才高峰”项目(2015-NY-048); 江苏省农业三新工程项目[SXGC(2016) 224]; 江苏省农科院颠覆性计划项目[ZX(17) 2002]; 江苏省农业自主创新基金项目[CX(15) 1057]; 扬州市科技支撑计划项目(YZ2015027)

作者简介: 徐 健(1968-), 男, 江苏兴化人, 博士, 研究员, 主要从事农业病虫害生物防治研究。(Tel) 13901458077; (E-mail) bio-xj@163.com

通讯作者: 刘 琴, (Tel) 0514-87637599; (E-mail) bio-lq@126.com

CnmeGV had significant interference effect on the population of rice leaffolder. Index of population control under different concentrations ranged from 0.31 to 0.32. CnmeGV had strong pathogenicity to the rice leaffolder, and the larvae had long death cycle. Field application of CnmeGV reduced the population trend index remarkably and restrained the population growth of rice leaffolder.

Key words: *Cnaphalocrocis medinalis*; granulovirus; virus infection; population regulation

杆状病毒(Baculovirus)是特异性感染节肢动物的环状双链 DNA 病毒,主要分为核型多角体病毒(Nucleopolyhedrovirus, NPV)和颗粒体病毒(Granulovirus, GV)。宿主以昆虫纲中的鳞翅目、双翅目、膜翅目、鞘翅目和毛翅目昆虫为主,其中寄生鳞翅目昆虫的杆状病毒多达 400 余种^[1]。由于杆状病毒对人类和环境安全、寄主专一以及在害虫种群中的扩散传播形成对害虫种群的自然调控作用,杆状病毒作为重要的生防因子在害虫综合治理中受到广泛关注^[2]。苹果蠹蛾(*Cydia pomonella*)颗粒体病毒(CpGV)、甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)核型多角体病毒(SeNPV)、梨豆夜蛾(*Anticarsia gemmatilis*)核型多角体病毒(AgNPV)、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 核型多角体病毒(HaNPV)等多种杆状病毒被深入研究并推广应用^[3-4]。

稻纵卷叶螟(*Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée))是东南亚和中国水稻上的重要害虫^[5-8]。多种化学农药品种多次大量的使用不仅并未从根本上控制稻纵卷叶螟的爆发危害,还造成了水稻农药残留和严重的面源污染。庞义等^[9]首次报道广州恩平县稻纵卷叶螟幼虫感染流行性病毒病,病原为稻纵卷叶螟颗粒体病毒(*C. medinalis* granulovirus, CnmeGV)。张珊等^[10]在时隔 30 多年 CnmeGV 的首次采集地恩平县,再次发现感染 CnmeGV 死亡的稻纵卷叶螟幼虫,表明该病毒具有田间控制目标害虫的持效性能。江苏里下河地区农科所在野外稻田自然罹病死亡的稻纵卷叶螟幼虫体内分离获得稻纵卷叶螟病毒,扫描电镜、病理学和分子生物学鉴定为颗粒体病毒^[11],同时首次完成了全基因组测序分析^[12]。CnmeGV 对稻纵卷叶螟具有较强的侵染力,10⁵ OB/mg 浓度处理害虫感染率达 92%,作为潜在的生物控制因子具有重要的应用价值^[13]。CnmeGV 是侵染稻纵卷叶螟的专性杆状病毒,相关研究特别是稻田自然条件下病毒对害虫的致病性及种群动态的影响报道较少。本研究拟通过田间应用 CnmeGV 结合组建自然种群生命表进一步明确 CnmeGV 对稻纵卷叶螟的侵染及种群的干扰调控作用,为应用杆状病毒生物防治稻纵卷叶螟提供依据。

1 材料与方法

1.1 CnmeGV 的增殖

以江苏里下河地区农业科学研究所实验室保存的 CnmeGV 原始病毒液接种感染稻纵卷叶螟幼虫。

幼虫繁殖参考 Xu 等^[14]方法采用人工饲料饲养。选择 2 龄中期稻纵卷叶螟幼虫预饥 6 h 后,接种于均匀混合 1×10⁵ OB/g 浓度 CnmeGV 的人工饲料上,在 (25.0±0.5)℃、相对湿度 80%、光照度 2 000 lx 的恒温昆虫饲养室饲养 2 d 后,隔日更换新鲜人工饲料并观察虫体感病情况。饲养 8~15 d,收集感病死亡的虫尸,研磨、匀浆、过滤,滤液经差速离心,得纯化的颗粒体病毒。用血球计数板计数颗粒体病毒含量,以无菌水稀释至 1×10¹⁰ OB/ml 后置 4℃ 保存备用。

1.2 田间试验

试验地位于扬州市甘泉镇,常年稻麦轮作,规律性发生稻纵卷叶螟危害。第 1 代害虫于当年 6 月底迁入,繁殖代及 7 月下旬迁入的稻纵卷叶螟构成第 2 代成为主要危害代。试验地约 0.2 hm²,种植水稻品种为扬稻 6 号(江苏里下河地区农业科学研究所选育)。试验设 CnmeGV 不同浓度和空白对照 3 个处理,每处理重复 3 次,共 9 个小区,每小区 150 m² (10 m×15 m),移栽水稻秧苗 4 500 穴。小区间间隔 1 m,栽插 4 行水稻作为保护行,小区统一肥水管理。7 月下旬稻纵卷叶螟第 2 代幼虫孵化高峰期施药, CnmeGV 设 7.500×10⁵ OB/m² 和 1.125×10⁶ OB/m² 2 个浓度,按 75 ml/m² 用水量稀释喷雾,对照组以等量清水喷雾。

1.3 田间取样和调查

施药后隔日田间调查不同处理区稻纵卷叶螟幼虫的存活率、病毒感染率。每小区随机 5 点取样,每点 10 穴,逐穴调查幼虫的残留存数,并根据稻纵卷叶螟幼虫感染 CnmeGV 虫体浊白、体节臃肿的感病症状区分记录感染虫数。设定对照组幼虫自然死亡率为 0,处理组虫口减退率则计算为其相对死亡率。处理区幼虫感染数除以总活虫数则计算为 CnmeGV 感染率。幼虫发育历期 3~4 龄期,不同处理区采集 50 头幼虫于实验室饲养,观察计算绒茧蜂、寄生蝇等天敌寄生率。施药后 20 d,各小区分别记录残存幼虫虫龄,参考实验种群各龄历期^[14],各处理组调查总虫龄历期以对照组总虫龄历期校正计算获得预期发育历期。另采集高龄幼虫 50 头,室内饲养直至羽化,观察记录化蛹羽化情况,计算化蛹率、羽化率。

施药前 3 d 田间成虫盛发期,用捕虫网采集 50 对成虫,市售体积为 125 ml 的一次性塑料杯中置 1 对成虫,加入浸有 10% 蜂蜜水的脱脂棉供其补充营养,

用保鲜膜封口,每日更换脱脂棉,让成虫交配产卵。成虫交配后产卵于杯壁上,逐日记录成虫的存活数和杯壁上的卵粒数,直至全部成虫死亡,计算成虫寿命及产卵量及孵化率。施药后 25 d,在不同处理区用捕虫网采集成虫,形态区分并计算性比,另取 50 对成虫,按上述方法产卵并计算产卵量及孵化率。

1.4 数据分析

1.4.1 幼虫存活曲线分析 以病毒处理区幼虫虫口相对减退率为处理区幼虫死亡率,根据威布尔频率分布理论模型(Weibull frequency distribution)^[15],参考周郁斌等^[16]方法,采用 Origin pro 8.0 拟合稻纵卷叶螟幼虫感染 CnmeGV 生长发育过程特定阶段存活率曲线方程: $S(t) = a - (a - b) \exp[-(tk)^d]$ 。拟合后采用 Log-Rank test 分析种群存活率曲线间的差异性^[17]。同时通过曲线方程计算幼虫感染病毒后死亡起始、50%死亡预期时间,明确 CnmeGV 对稻纵卷叶螟幼虫的致死作用。

1.4.2 自然种群生命表参数分析 参照昆虫种群生命表的制作方法^[18],根据田间调查的数据及同期饲养所获的数据,估算稻纵卷叶螟种群不同时期幼虫、各虫态的存活率,组建得到自然种群生命表,按如下方法计算生命表参数:

种群净增殖率 $R_0 = \sum l_x m_x$

内禀增长率 $r_m = (\ln R_0) / T$

周限增长率 $\lambda = e^{r_m}$

世代平均周期 $T = \sum l_x m_x x / \sum l_x m_x$

种群加倍时间 $DT = \ln 2 / r_m = 0.693 \ 1 / r_m$

公式中 l_x 表示 x 期间的存活率, m_x 表示 x 期间平均每雌产雌数。稻纵卷叶螟的幼虫历期、成虫寿命、产卵量等均用 DPS v7.05 数据处理系统进行 t -测验。

种群趋势指数 $I = N_2 / N_1 = S_1 S_2 S_3, \dots, S_k P_F P_\varnothing$, 式中 N_1, N_2 为当代和下代的种群数量, $S_1 S_2 S_3, \dots, S_k$ 为各作用因子相对应的存活率, P_\varnothing 为雌虫比率, P_F 为实际产出率。

种群控制指数 $IPC = I' / I$, 式中 I 为原有自然种群数量发展趋势指数, I' 为 CnmeGV 干扰作用下种群数量发展趋势指数,用以比较 CnmeGV 干扰条件下对种群数量发展趋势的控制作用。

2 结果与分析

2.1 CnmeGV 在稻纵卷叶螟种群中的感染

稻纵卷叶螟接触感染 CnmeGV 后,初始并不表

现明显的病毒感染症状,随着时间的推移,感病症状逐步呈现,表现出明显的杆状病毒感病症状,感病幼虫体节肿胀,行动迟缓,体色由正常的绿色半透明状逐渐变成灰白色而不透明,后期呈乳白色或略带黄色,罹死病虫从气孔释放出乳白色病毒液。田间应用 CnmeGV 后 6 d 田间始见感染病毒显症幼虫,8 d 感病虫量显著增加,显症感染率达 17.6%~19.53%,18 d 田间虫龄处于 3~4 龄,表现感病症状的虫量达 51.63%~54.23%,24 d 调查田间虫态主要以 5 龄和老熟幼虫为主,感病显症幼虫比例达 69.16%~70.77%。CnmeGV 不同浓度处理稻纵卷叶螟幼虫感染程度及变化规律基本一致(图 1)。

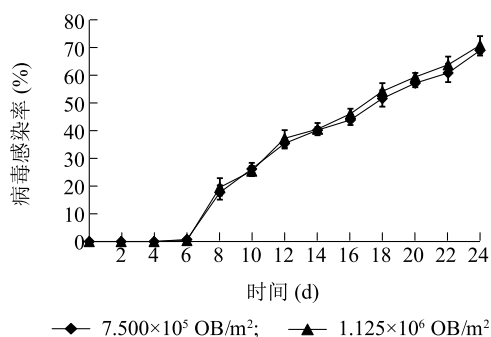


图 1 不同浓度 CnmeGV 处理后田间稻纵卷叶螟幼虫的病毒感染动态

Fig.1 The dynamic of rice leaffolder larvae infected by virus after spraying different concentration of CnmeGV

2.2 CnmeGV 感染幼虫存活曲线

稻纵卷叶螟感染 CnmeGV 后,虽表现出明显感病症状,但仍正常存活并不立即死亡,低龄幼虫死亡率低,但随着病毒感染程度的加重,高龄幼虫死亡率显著增加,化蛹前期达最大死亡高峰。以威布尔频率分布理论模型拟合稻纵卷叶螟种群生长发育过程不同阶段存活率曲线方程,低浓度处理区 (7.500×10^5 OB/m²) 幼虫存活率曲线方程为 $S(t) = 98.270 - 95.700 \exp[-(0.053t)^{-2.2}]$ ($R^2 = 0.9659$),高浓度处理区 (1.125×10^6 OB/m²) 幼虫存活率曲线方程为 $S(t) = 98.46 - 98.46 \exp[-(0.057t)^{-2.4}]$ ($R^2 = 0.9650$),感染病毒幼虫存活率曲线表现为死亡率是年龄的增函数,死亡主要发生在感病幼虫中后期发育个体中。田间稻纵卷叶螟感染 CnmeGV 预期初始死亡时间为 8.39~8.40 d,致死中时间为 20.16~21.98 d。Log-Rank test 检验结果表明,不同浓度生

存曲线差异不显著 ($\chi^2_{(1,0.05)} = 0.001\ 42, P = 0.951$), 种群动态的变化趋势基本一致 (图 2)。

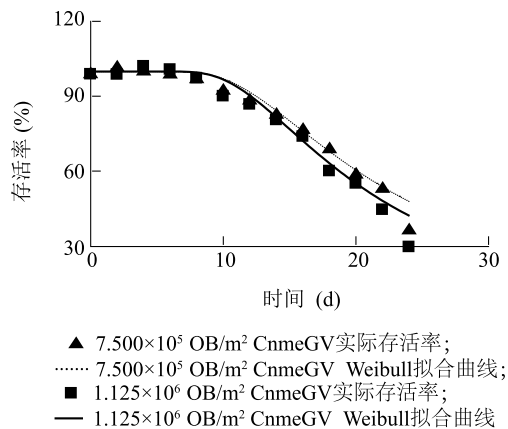


图2 CnmeGV 感染稻纵卷叶螟幼虫拟合威布尔分布方程存活曲线

Fig.2 Survival curve of CnmeGV infecting population fitting with the model of Weibull frequency distribution

2.3 CnmeGV 对稻纵卷叶螟种群的控制作用

根据田间调查结果结合室内饲养观察结果,组建了稻纵卷叶螟田间的自然种群生命表,得到 CnmeGV 为作用因子的稻纵卷叶螟自然种群生命表参数。由表 1 可以看出, CnmeGV 对稻纵卷叶螟种群具有明显的调控作用,感染 CnmeGV 的稻纵卷叶螟种群平均世代周期 (T) 延长了 2.45~2.79 d, 内禀增长率 (r_m) 下降了 40.21%~42.27%, 致使子代稻纵卷叶螟种群增长趋势指数 (I) 从 20.03 下降至 6.30 左右, 同时种群加倍时间 (DT) 增加了 4.79~5.14 d。采用种群干扰作用控制指数分析表明, CnmeGV 对稻纵卷叶螟种群控制作用明显。CnmeGV 不同浓度病毒处理区的种群控制指数 (IPC) 为 0.31~0.32, 说明稻纵卷叶螟种群在 CnmeGV 干扰下子代种群增长趋势下降为对照的 0.3 倍。

3 讨论

CnmeGV 是感染稻纵卷叶螟幼虫的专性杆状病毒, 田间害虫卵孵化高峰期喷施病毒, CnmeGV 通过稻纵卷叶螟幼虫取食感染并逐步显症, 后期田间种群感病率达 70% 左右, 表明 CnmeGV 在一定浓度条件下对稻纵卷叶螟具有较强的致病性, 这种侵染致病能力有助于病毒在稻纵卷叶螟种群中传播扩散^[19]。

表 1 田间 CnmeGV 不同浓度处理稻纵卷叶螟自然种群生命表参数

Table 1 The life table parameters of natural population of rice leaf folder treated with CnmeGV

生命表参数	对照	CnmeGV 7.500×10 ⁵ OB/m ²	CnmeGV 1.125×10 ⁶ OB/m ²
平均世代周期 (T)	33.21	36.00	35.66
内禀增长率 (r_m)	0.097	0.056	0.058
周限增长率 (λ)	1.10	1.06	1.06
种群加倍时间 (DT)	7.17	12.31	11.96
种群趋势指数 (I)	20.03	6.35	6.32
控制指数 (IPC)	1.00	0.31	0.32

昆虫感染杆状病毒到死亡需要经过一个缓慢的周期, 杆状病毒 DNA 进入细胞核经过复制、组装、转移侵染而增殖感染引起宿主死亡^[20]。稻纵卷叶螟幼虫感染 CnmeGV 一般在感病显症 8.39~8.40 d 开始死亡, 感病幼虫前期和中期仍能卷叶取食造成危害, 感病幼虫存活率曲线预期致死中时间需 20 d 以上。刘琴等^[13]通过 CnmeGV 结合苏云金杆菌防治稻纵卷叶螟, 不仅显著提高了田间稻纵卷叶螟的死亡率, 而且病毒感染显症时间缩短了 3 d, 感染死亡率增加了 20.23%。这种增效作用可能源于稻纵卷叶螟取食 Bt 毒素蛋白后直接造成害虫中毒死亡, 未死亡的个体虫体免疫能力下降, 提高了病毒的致病性^[21], 因此可以考虑田间应用 CnmeGV 防治稻纵卷叶螟时结合苏云金杆菌等生物农药, 以提高对稻纵卷叶螟的直接防治效果, 同时提高害虫的病毒感染率。

单一以虫口减退率或卷叶率等直接防治指标并不能全面反映杆状病毒对靶标害虫的控制作用^[22]。通过构建稻纵卷叶螟感染 CnmeGV 田间种群生命表, 应用种群控制指数评价害虫控制效果, 进一步反映了杆状病毒对稻纵卷叶螟种群发展趋势的实际干扰控制作用。试验结果表明, 以种群趋势指数和种群控制指数进行评价, CnmeGV 对稻纵卷叶螟种群动态具有明显的影响, 应用 CnmeGV 后子代种群趋势指数下降了 3 倍, 可以有效控制稻纵卷叶螟的种群增长和爆发危害。

杆状病毒在野外昆虫种群中能引起流行病, 导致继代持续带毒、感病死亡, 长时间内自然控制种群消长^[23]。目前杆状病毒在昆虫种群中的流行性研

究主要集中在森林、果园等连续、稳定生态系统的害虫防治中^[24]。农作物由于周期性的收获,直接干扰了杆状病毒的侵染和传播,相关报道较少。水稻(单季稻)一般生育期长达 150 d,水稻生长周期中稻纵卷叶螟持续危害,一般发生3~5代,害虫种群生态相对稳定,有利于 CnmeGV 在稻纵卷叶螟种群中扩散,在子代种群中持续传播,从而控制种群增长,降低危害程度,减少稻田农药使用量。

参考文献:

- [1] ROHRMANN G F. Baculovirus molecular biology (3rd edition) [M]. Corvallis: Department of Microbiology Oregon State University, 2014.
- [2] POPHAM H J, NUSAWARDANI T, BONNING B C. Introduction to the use of baculoviruses as biological insecticides [J]. Methods in Molecular Biology, 2007, 1350(388): 359-366.
- [3] SZEWCZYK B, HOYOS-CARVAJAL L, PALUSZEK M, et al. Baculoviruses—re-emerging biopesticides [J]. Biotechnology Advances, 2006, 24(2): 143-160.
- [4] 秦启联,程清泉,张继红,等.昆虫病毒生物杀虫剂产业化及其展望[J]. 中国生物防治学报, 2012, 28(2): 157-164.
- [5] SHEPARD B M, BARRION A T, LISTINGER J A. Rice feeding insects of tropical Asia[M]. Philippines: IRRI, 1995.
- [6] 程家安. 水稻害虫 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.
- [7] 周奋启,康晓霞,陈银凤,等.扬州市邗江区稻纵卷叶螟发生特点及防治技术[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(3): 140-145.
- [8] 王 琳,包云轩,谢晓金,等.基于地统计法的稻纵卷叶螟时空变化特征[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(1): 50-55.
- [9] 庞 义,濂涌流,刘 炬,等.稻纵卷叶螟颗粒体病毒[J]. 微生物学通报, 1981, 8(3): 103-104.
- [10] 张 珊,贾茜雯,孙士锋,等.一株稻纵卷叶螟颗粒体病毒的系统发育和流行病学调查 [J]. 环境昆虫学报, 2014, 36(5): 756-776.
- [11] XU J, LI C M, HAN G J, et al. *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) Granulovirus, a potential microbial agent against the rice leaffolder *Cnaphalocrocis medinalis* Guenée (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. Egyptian Journal Biological Pest Control, 2016, 26(4): 675-681.
- [12] HAN G J, XU J, LIU Q, et al. Genome of *Cnaphalocrocis medinalis* granulovirus, the first crambidae-infecting Betabaculovirus isolated from rice leaffolder to sequenced [J]. PLoS ONE, 2016, 11(2): e0147882.
- [13] 刘 琴,徐 健,王 艳,等. CmGV 与 Bt 对稻纵卷叶螟幼虫的协同作用研究 [J]. 扬州大学学报(农业与自然科学版), 2013, 34(4): 89-93.
- [14] XU J, LI C M, YANG Y J, et al. Growth and reproduction of artificially fed *Cnaphalocrocis medinalis* [J]. Rice Science, 2012, 19(3): 247-251.
- [15] PINDER J E, WIENER J G, SMITH M H. The weibull distribution: A new method of summarizing survivorship data [J]. Ecology, 1978, 59(5): 175-179.
- [16] 周郁斌,袁中文,李海刚,等. 用 Origin 软件计算药物溶出度 Weibull 分布参数[J]. 医药导报, 2011, 30(6): 721-723.
- [17] SOKAL R R, ROHLF F J. Biometry (3rd edition) [M]. New York: W H Freeman and Company, 1998.
- [18] 庞雄飞. 害虫种群的生态控制 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [19] LACEY L A, THOMSON D, VINCENT C, et al. Codling moth granulovirus: a comprehensive review [J]. Biocontrol Science and Technology, 2008, 18: 639-663.
- [20] CORY J S, FRANKLIN M T. Evolution and the microbial control of insects [J]. Evolutionary Applications, 2012, 5(5): 455-469.
- [21] HAN G J, LI C M, LIU Q, et al. Synergistic effect of combining *Plutella xylostella* granulovirus and *bacillus thuringiensis* at sublethal dosages on controlling of diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae) [J]. Journal of Economic Entomology, 2015, 108(5): 2184-2195.
- [22] 冼继东,卢传全,庞雄飞. 颗粒体病毒对小菜蛾种群控制作用的评价 [J]. 海南大学学报(自然科学版), 1997, 15(2): 138-140.
- [23] FUXA J R. Ecology of insect nucleopolyhedroviruses [J]. Agriculture, Ecosystems and Environment, 2004, 103(1): 27-43.
- [24] CORY J S, MYERS J. The ecology and evolution of insect baculoviruses [J]. Annual Review of Ecology Evolution and Systematics, 2003, 34(1): 239-272.

(责任编辑:姜华珏)