

昆虫杆状病毒的研究与应用

王晓玲^{1*}, 魏美才¹, 夏春兰²

(1. 中南林业科技大学生命科学与技术学院, 湖南 长沙 410004; 2. 湖南省永州市冷水滩林业局, 湖南 永州 425000)

摘要: 杆状病毒是鳞翅目昆虫的重要病原微生物, 在重要农业害虫的生物防治中具有很大的应用前景。同时, 杆状病毒—昆虫细胞表达系统是一类重要的真核表达系统, 现已成为目前基因工程四大表达系统之一。另外, 杆状病毒是非复制型载体, 能高效表达目的蛋白, 其作为基因转移载体在基因治疗中已显示出良好的应用前景。文中综述了杆状病毒在以上方面应用的最新进展。

关键词: 杆状病毒; 杆状病毒载体; 重组杆状病毒; 基因治疗; 杆状病毒杀虫剂

中图分类号: S432.4⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2006)06-0061-05

Insect Baculovirus: Recent Research and Application

WANG Xiao-ling¹, WEI Mei-cai¹, XIA Chun-lan²

(1. College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry & Technology, Changsha 410004, China;

2. Forestry Bureau of Lengshuitan District, Yongzhou City of Hunan Province, Yongzhou 425000, China)

Abstract: Baculoviruses are arthropod specific viruses that have long been used as biological agents to control the insects attacking crop plants. They are also the key components of insect-baculovirus expression system (BEVS), which has been one of the four main expression systems in gene engineering. Additionally, baculovirus has been a new gene transfer vector used in gene therapy due to its advantages of the extremely high expression of foreign genes and being non-reproduce vector. The advances in application of Baculoviruses are reviewed in this paper.

Key words: Baculovirus; Baculovirus vector; Recombinant baculovirus; Gene therapy; Baculovirus pesticide

杆状病毒是昆虫专一性的病原病毒, 是发现最早、研究最多且实用意义很大的昆虫病毒^[1,2]。近年来, 昆虫杆状病毒的研究已引起人们的高度重视, 其主要原因为: (1) 昆虫杆状病毒可作为真核表达载体系统表达外源基因, 在药物研发、疫苗生产等方面有广泛的应用; (2) 杆状病毒作为基因转移载体可用于基因治疗; (3) 作为一类重要的微生物杀虫剂, 可有效地控制农林害虫的发生, 但对环境不造成污染, 对人、畜安全。文中对其最新应用进展进行了综述。

1 杆状病毒载体表达系统研究的最新进展

杆状病毒表达载体系统 (Baculovirus expression

vector system, BEVS) 是一个以昆虫杆状病毒为外源基因载体, 以昆虫和昆虫细胞为受体的表达系统。与其他类表达系统相比, 它具有安全性高, 对外源基因克隆容量大, 重组病毒易于筛选, 具有完备的翻译后加工修饰系统和高效表达外源基因的能力等特点^[3,4]。昆虫杆状病毒载体系统的建立和发展, 被誉为 20 世纪 80 年代真核表达研究领域的一个重大进展。

自从 1983 年 Smith 和 Summers 首次利用苜蓿丫纹夜蛾核型多角体病毒 (AcMNPV) 成功表达人 β -干扰素以来, 现已有数百种外源基因在杆状病毒载体系统中得到表达^[3-5]。

收稿日期: 2006-01-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070627)

作者简介: 王晓玲 (1976-), 女, 湖南长沙人, 硕士, 主要从事微生物学和林业生物技术的教学与研究工作。为通讯作者。

外源基因在昆虫细胞中表达水平差异较大, 有的只有 1 mg/L, 但高的可达 600 mg/L。用 NPV 载体生产外源基因较有效的途径是用带有外源基因的重组病毒直接感染昆虫幼虫。在各表达系统中, 家蚕(*B. mori*)核型多角体病毒(BmNPV)——家蚕表达系统是较理想的系统。利用家蚕作为生物反应器, 季平等已成功表达了慈姑蛋白酶抑制剂 B 基因、乙肝病毒表面抗原基因、禽马立克氏病毒糖蛋白 B 抗原基因和促黄体素释放激素与乙肝表面抗原嵌合的基因等^[6]。

近年来杨林等进行了 GST 融合蛋白在杆状病毒系统中表达的可溶性研究^[7]。朱长军等首次利用既能高效表达外源基因又能形成多角体的杆状病毒表达系统表达了抑癌基因 *p16INK4*, *p16INK4*, 对于进一步研究抑癌蛋白 P16 的结构与功能及其在肿瘤生物治疗中有着重要意义^[8]。张传溪等进行了棉铃虫核型多角体病毒几丁质酶基因和杆状病毒几丁质酶基因的分子进化研究^[9]; 还在家蚕体中高效表达了人促红细胞生成素(EPO)基因^[10]。目前, 浙江大学、上海生物化学研究所和有关企业共同开发的, 以蚕体为生物反应器生产的人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(humGM-CSF)药物已研制成功。上海生物化学研究所首创了可线性的 BmNVP, 大大提高了 BmNVP 的重组效率^[10]。

最近, 一些学者采用杆状病毒表达系统对 SARS 和禽流感病毒 HA 进行了研究。王喜军等^[11]成功构建了表达 SARS-CoV S 蛋白重组杆状病毒, 并在昆虫细胞获得特异表达。昆虫细胞表达 rSS 与灭活 SARS-CoV 全病毒高免血清和感染耐过病人阳性血清均具有良好、特异的免疫反应原性。因此, 杆状病毒表达的 rSS 有望替代 SARS-CoV 全病毒, 作为安全、敏感和特异的重组诊断抗原, 并为探索重组亚单位疫苗的可行性奠定基础。

胡森等^[12]的研究结果表明, 昆虫细胞表达的重组 SARS-CoV N 蛋白具有免疫反应原性良好、制备简便和来源丰富的特点。该蛋白有望替代 VeroE6 细胞生产的 SARS-CoV 全病毒抗原, 研制安全经济、敏感特异的 ELISA 和 IFA 诊断试剂, 应用于动物或人类 SARS-CoV 特异抗体反应血清学研究和检测, 特别是大规模的流行病学监测。

贾世海等^[13]利用昆虫杆状病毒表达了 SARS 冠状病毒的 2 个主要结构蛋白——刺突蛋白和膜蛋白。

李永强等^[14]构建了融合型表达禽流感病毒 HA 基因杆状病毒转移载体, 与线性化杆状病毒共转染 Sf9 细胞, 经 3 轮蚀斑克隆, 获得重组杆状病毒

rBa-chisH5HA, 为表达、纯化 HA 蛋白及研制预防禽和人禽流感病毒亚单位疫苗的研制奠定了基础。

此外, 牙釉蛋白^[15]、花粉变应原 Ole e 10 蛋白^[16]也在昆虫杆状病毒表达系统中得到了表达。Wang 等^[17]应用杆状病毒载体对蚕丝蛋白重链信号肽进行了体内分析。

2 杆状病毒用于基因治疗

杆状病毒是非复制型载体, 且重组杆状病毒载体具有容量大、易操作、易纯化和安全性高, 因而是一种很有应用前景的基因转移载体^[18, 19]。

用含有 CMV(巨细胞病毒)启动子和绿色荧光报告基因(*gfp*)的病毒进行有效的杆状病毒介导性转导, 已在一系列细胞系和原代培养物中证实。另一种能有效并稳定地将重组基因导入细胞的杆状病毒载体也已报道。这种病毒含有 1 对表达盒(B-gal 和潮霉素抗性), 并以来自腺病毒伴随病毒(AAV)的倒置末端重复序列(ITR)为侧翼^[18~22]。目前, 在体外可转导的哺乳动物细胞见表 1。

表 1 可用重组杆状病毒转导的哺乳动物细胞^[18]

哺乳类别	细胞名称
人	HepG2(肝细胞); HuH7(肝细胞); Sk-Hep-1(肝细胞); HeLa(宫颈癌细胞); W12(角化细胞); A 549(肺细胞); WI-38(肺纤维原细胞); 239(肾细胞); Ramos(B 细胞); Jurkat(T 细胞); HL-60(骨髓细胞); K-562(髓细胞)
猴	COS7(肾细胞); CV-1(肾细胞)
猪	CPK(肾细胞); FS-L3(肾细胞)
兔	RGM 1(胃粘膜细胞); PC12(肾上腺细胞)
鼠	NIH3T3(胚纤维原细胞); C2C12(肌肉细胞)
仓鼠	CHO(卵巢细胞)

目前, 杆状病毒在体外转导哺乳动物细胞较容易, 但在体内转导尚有较大的困难, 主要是由于体内血清中补体系统的中和阻碍作用^[23]。消除杆状病毒的补体敏感性已有相应的方法。例如, 将杆状病毒注射到 AKP 补体缺陷小鼠肝内, 可在注射部位附近得到有效表达; 而将在哺乳动物细胞中表达荧光素酶的杆状病毒注射入补体缺陷的 A/J 品系小鼠的尾静脉中则可在脾、肝和肾中得到该基因的表达; 使用补体活性调节因子可保护病毒在血清处理后不致灭活。补体抗性病毒现已可用衰变加速因子(DAF)构建, DAF 可通过增加补体降解率来调节补体复合物^[18, 19, 24]。含有 gp642DAF 融合包膜蛋白的病毒可在新生大鼠肝内注射后瞬间表达人因子 IX 基因。此外, 用抗 C5(补体蛋白)抗体或用眼镜蛇毒素因子处理血清后, 血清便不能完全使病毒失

活。这也为克服补体系统的阻碍作用提供了一个可能的方法^[18, 19, 24, 25]。

目前, 杆状病毒的侵入和转导机制尚不清楚。而且不同细胞与病毒的作用机理不同^[18, 19]。如对 Huh7 细胞的转导表明, 病毒与其细胞的结合呈饱和和动力学特征。病毒必须通过与细胞基膜表面的作用进入细胞, 以发挥其转导作用。相反, 此病毒与 293 细胞的作用表明, 其转导作用在大病毒剂量下并不饱和, 这意味着病毒与细胞间可能存在非特异作用^[18, 19]。另外, 静电作用对病毒结合十分重要, 说明细胞表面的肝素硫酸盐残基可能是结合的主体。但在对 HepG2 细胞的研究中发现, 细胞膜的磷脂对病毒进入的启动很重要。特别是带负电的磷脂酸和磷脂酰肌醇可能抑制病毒的转导, 而肝素和肝素硫酸盐则不然^[18, 19]。

总之, 重组杆状病毒作为基因转移载体应用于哺乳动物细胞已经得到广泛的证实。杆状病毒通过一种尚未阐明的侵入机制, 使其成为一个能对许多哺乳动物细胞系进行高效转移的载体。但许多问题, 特别是体内转导及其机制等需要进一步研究和解决。

3 杆状病毒杀虫剂的应用

3.1 杆状病毒杀虫剂概况

昆虫杆状病毒对许多害虫比较敏感。杆状病毒占有可感染昆虫病毒的 60% 以上。目前, 至少已有 600 多种昆虫(主要是鳞翅目昆虫)和其他无脊椎动物中发现杆状病毒感染^[26]。作为微生物杀虫剂, 杆状病毒具有优异的性能。首先, 杆状病毒的宿主范围很窄, 他们对其他非目标昆虫的影响很小, 对人畜、天敌和环境安全。其次, 杆状病毒的杀虫效果较好, 如在虫害发生前期使用, 其防治效率可达 99% 以上。此外, 杆状病毒产生的包含体具有侵染性病毒颗粒, 对环境的生物稳定性有一定作用; 同时, 杆状病毒的这种特点也便于利用传统技术来制造和应用病毒。由于杆状病毒的上述特点, 特别是它对人畜、天敌和环境比较安全, 因此, 它是生产绿色食品必不可少的生物农药, 其市场前景看好。从 1985 年国家在湖北蒋湖农场投资建立我国第 1 个棉铃虫病毒杀虫剂工厂以来, 已有多种病毒杀虫剂研制成功, 并进入批量生产, 在发展“无公害”蔬菜生产中发挥了重要的作用。

目前, 国内外已大量使用杆状病毒杀虫剂, 特别是巴西利用杆状病毒防治大豆害虫取得了巨大成

功。据报道, 巴西使用杆状病毒防治大豆害虫, 每年可节省费用 1 100 万美元, 同时还免去了 1 700 万 t 化学农药的使用, 因此, 具有巨大的经济和生态效益^[26, 27]。目前, 国内外正式注册商品化的杆状病毒杀虫剂有近 20 种^[26~28]。

3.2 重组杆状病毒杀虫剂及其安全性

野生型杆状病毒存在杀虫速度较慢, 毒力较低, 对高龄害虫需用量大等缺点。解决这一问题的方法是对其进行基因重组改造。即通过增加具有高效杀虫活性的外源基因, 或删除某些自身基因, 进行基因改造。目前, 已成功实现重组表达的外源基因蛋白有蝎子毒素、以色列亚种 δ -内毒素、马(黄)蜂毒素、几丁质酶基因、利尿激素、保幼激素酯酶、羽化激素、慈菇蛋白酶抑制剂 B 基因 *API-B*、植物蛋白酶抑制剂、昆虫病毒增强蛋白基因等^[29, 30]。最近, 钳蝎类 (*Buthus tamulus*) 昆虫选择性毒素蛋白 (ButalT) 也在杆状病毒中得到了重组表达^[31]。

由以上方法研制的重组杆状病毒的杀虫效果与野生型杆状病毒相比, 其杀虫效果可提高 20% ~ 70%^[26]。因而具有很好的应用前景。然而重组杆状病毒杀虫剂的生物安全性, 引起了人们的担心。这是因为尽管野生型杆状病毒杀虫剂的安全性已证实, 但重组病毒杀虫剂由于其基因组发生了改变, 或增加了外源基因, 或删除了某些基因, 因而其安全性需要重新考虑^[27]。但目前许多学者认为, AcNPV 只是以 DNA 形式作载体将外源基因导入哺乳动物细胞, 并不是 AcNPV 的病毒颗粒对哺乳动物细胞造成感染。病毒 DNA 进入细胞不能复制, 并不会造成细胞病变。而且外源基因在哺乳动物细胞中的表达并不能利用 AcNPV 本身的启动子, 因而他们认为杆状病毒对哺乳动物是高度安全的^[32]。而且现有的研究都表明重组病毒对环境的影响和危险较低^[26, 33~35]。但重组杆状病毒杀虫剂尚未大面积推广, 因此, 有关安全性还有待于大量的田间应用检验。

参考文献:

[1] Ji W J, Zhang XY, Hu H C, *et al.* Expression and purification of Huwentoxin-I in baculovirus system[J]. Protein Expres Purif, 2005, 41: 454-458.
[2] Piluso L G, Wei G, Li A G, *et al.* Purification of acetyl-p53 using p300 co-infection and the baculovirus expression system[J]. Protein Expres Purif, 2005, 40: 370-378.
[3] Yamaji H, Manabe T, Kitaura A, *et al.* Efficient pro-

duction of recombinant protein in immobilized insect cell culture using serum-free basal media after baculovirus infection[J]. *Biochem Eng J*, 2006, 28: 67—72.

- [4] Possee R D. Baculoviruses as expression vectors[J]. *Opin Biotech*, 1997, 8: 569—572.
- [5] Shinkai A, Shinodac K, Monishita Y, *et al.* High-level expression alpha-1, 3-fucosyltransferase in baculovirus-infected insect cells[J]. *Protein Express Purif*, 1997, 10(3): 379—385.
- [6] 洪清君, 段家龙. 昆虫杆状病毒基因工程研究新进展[J]. *生物技术*, 2002, 12(1): 31—32.
- [7] 杨林, 李国清, 黄葆英, 等. GST 融合蛋白在杆状病毒系统中表达的可溶性研究[J]. *中国病毒学*, 2000, 15(2): 143—146.
- [8] 朱长军, 张利宁, 马春红, 等. 抑癌基因 p16INK4 真核表达载体的构建及其表达[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2000, 7(1): 65—66.
- [9] 张传溪. 棉铃虫核型多角体病毒几丁质酶基因及杆状病毒几丁质酶基因的分子进化[J]. *昆虫学报*, 2000, 43(3): 233—241.
- [10] 张传溪, 姜育蕾, 胡萃, 等. 人促红细胞生成素基因在家蚕中的高效表达[J]. *生物工程学报*, 2000, 16(1): 46—50.
- [11] 王喜军, 胡森, 王清华, 等. 杆状病毒表达 SARS 冠状病毒纤突蛋白及其抗原性分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2005, 27(6): 550—553.
- [12] 胡森, 王喜军, 王清华, 等. 杆状病毒表达 SARS 冠状病毒核蛋白抗原性的研究[J]. *中国人兽共患病杂志*, 2006, 21(4): 21—24.
- [13] 贾世海, 周博, 吴峻, 等. 利用昆虫杆状病毒表达 SARS 冠状病毒的刺突蛋白和膜蛋白[J]. *细胞生物学杂志*, 2006, 28(1): 84—88.
- [14] 李永强, 孟庆文, 冉多良, 等. 表达带 His2tag 的禽流感病毒 HA 基因杆状病毒转移载体的构建及重组病毒的鉴定[J]. *新疆农业大学学报*, 2005, 28(4): 53—55.
- [15] Taylor A L, Filderman A H, Blumenfeld A, *et al.* High yield of biologically active recombinant human amelogenin using the baculovirus expression system[J]. *Protein Express Purif*, 2006, 45: 43—53.
- [16] Barral P, Serrano A G, Batanero E, *et al.* A recombinant functional variant of the olive pollen allergen Ole e 10 expressed in baculovirus system[J]. *J Biotechnol*, 2006, 121: 402—409.
- [17] Wang S P, Guo T Q, Guo X Y, *et al.* In vivo analysis of fibroin heavy chain signal peptide of silkworm *Bombyx mori* using recombinant baculovirus as vector[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 341: 1203—1210.
- [18] Ghosh S, Parvez M K, Banerjee K, *et al.* Baculovirus as mammalian cell expression vector for gene therapy: an emerging strategy[J]. *Molecular Thera*, 2002, 6(1): 5—11.
- [19] Kost T A, Condreay J P. Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vector [J]. *Trends Biotechnol*, 2002, 20(4): 173—180.
- [20] Haeseleer F, Imanishi Y, Saperstein D A, *et al.* Gene transfer mediated by recombinant baculovirus into mouse eye[J]. *Invest Ophthalmol Visual Sci*, 2001, 42: 3294—3300.
- [21] Pieroni L, Maione D, La Monica N. In vivo gene transfer in mouse skeletal muscle mediated by baculovirus vectors[J]. *Hum Gene Ther*, 2001, 12: 871—881.
- [22] Matsuo E, Tani H, Lim C K, *et al.* Characterization of HCV-like particles produced in a human hepatoma cell line by a recombinant baculovirus[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 340: 200—208.
- [23] Sarkis C, Sergucra C, Petres S, *et al.* Efficient transduction of neural cells in vitro and in vivo by a baculovirus driven vector[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(26): 14638—14643.
- [24] Hofmann C, Huser A, Lehnert W, *et al.* Protection of baculovirusvectors against complement-mediated inactivation by recombinant soluble complement receptor type 1[J]. *Biol Chem*, 1999, 380: 393—395.
- [25] Huser A, Rudolph M, Hofmann C. Incorporation of decayaccelerating factor into the baculovirus envelope generates complement-resistant gene transfer vectors [J]. *Nature Biotechnol*, 2001, 19(5): 451—455.
- [26] Szewczyk B, Hoyos-Carvajal L, Paluszek M, *et al.* Baculoviruses re-emerging biopesticides[J]. *Biotechnol Advances*, 2006, 24: 143—160.
- [27] 惠丰立, 夏敏, 梁子安. 杆状病毒杀虫剂研究进展[J]. *植物保护*, 2003, 29(3): 9—11.
- [28] Inceoglu A B, Kamitas S G, Hinton A C, *et al.* Recombinant baculoviruses for insect control[J]. *Pest Management Science*, 2001, 57: 981—987.
- [29] Smith C R, Kevin M H, Christopher G S, *et al.* Impact of recombinant baculovirus application on target beetliothines and nontarget predators in cotton[J]. *Biological Control*, 2000, 19: 201—214.
- [30] 梁布锋, 刘润忠, 张友清. 重组杆状病毒杀虫剂的研制和田间试验[J]. *中国生物防治*, 1997, 13(4): 179—181.

防除覆膜直播棉花杂草药效试验

马光春¹, 靳中权²

(1. 新乡县植保植检站, 河南 新乡 453003; 2. 项城市农业科学研究所, 河南 项城 466200)

摘要: 2005 年, 在覆膜直播棉田试验了施田补、农思它、稻思达对各类杂草的防除效果, 结果表明: 药后 20 d、45 d, 除农思它低剂量(900 ml/hm²)外, 其余各处理的除草总防效均在 90% 以上, 以施田补(2 250 ml/hm²)效果最好, 防效在 96% 以上, 且各处理对棉花安全, 增产效果明显。

关键词: 直播棉田; 杂草; 防效

中图分类号: S451.223⁺ **文献标识码:** A **文章编号:** 1004—3268(2006)06—0065—02

棉田杂草是影响棉花增产的障碍因素之一, 为了选择广谱、高效、安全, 且能一次性防除直播棉田杂草的除草剂, 2005 年, 在覆膜直播棉田进行了施田补、农思它、稻思达对各类杂草的防效, 现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 供试药剂

25%农思它 EC(有效成分: 噻草酮)拜耳作物科学公司生产, 80%稻思达 WP(有效成分: 异噻唑草酮)拜耳作物科学公司生产, 33%施田补 EC(有效成分: 二甲戊乐灵)巴斯夫股份有限公司生产。

1.2 试验地基本情况

试验田设在河南省新乡市永安村南地。土质属两合土, 偏粘性, 有机质含量 1.2~1.3 g/kg, pH 值 7.0 左右。灌溉便利, 常年杂草发生较重, 主要杂草种类有: 马唐[*Digitaria sanguinalis* (L)Scop]、牛筋草[*Eleusine indica* (L)Gaertn]、马齿苋(*Portulaca*

oleracea L)、反枝苋(*Amaranthus retroflexus* L)等。前茬为玉米, 冬季闲置, 未种任何作物。上茬玉米田及闲置期间未曾使用除草剂。

2005 年 4 月 17 日灌水, 4 月 21 日用旋耕耙耩地 2 遍, 于 2005 年 4 月 22 日进行播种、施药、覆膜。品种为高新抗五号, 播量 30 kg/hm²。

1.3 试验处理及施药情况

试验处理有: 25%农思它 900, 1 350, 1 800 ml/hm², 稻思达 180, 225, 255 g/hm² 和 33%施田补 2 250 ml/hm² 以及空白对照。

试验小区按随机区组排列, 3 次重复, 小区面积 33 m²。2005 年 4 月 22 日棉花播种后, 用“没得比”喷雾器加扇形喷雾头均匀喷雾, 每公顷用水量 450 kg, 施药时晴天、无风。施药后由于多风, 墒情丧失较快, 于 2005 年 4 月 29 日及时灌水 1 次。

1.4 调查方法

于药后 7 d、14 d 目测各处理对作物的药害率, 药后 20 d 调查对各种杂草株防效, 药后 45 d 调查对

收稿日期: 2005—12—29

作者简介: 马光春(1968—), 女, 河南新乡人, 高级农艺师, 本科, 主要从事植保技术推广工作。

[31] Rajendra W, Hackett K J, Buckley E, *et al.* Functional expression of lepidopteran-selective neurotoxin in baculovirus: Potential for effective pest management[J] . Biochim Biophys Acta, 2006, 1760: 158—163.

[32] 肖化忠, 齐一鹏, 杨复华. 杆状病毒杀虫剂安全评价的历史和现状[J] . 生物工程学报, 2001, 17(3): 236—240.

[33] Fuxa J R, Matler M M, Abdel—Rahman A, *et al.* Persistence and distribution of wild—type and recombinant nucleopolydoviruses in soil[J] . Microbiol Ecol, 2001, 41(3): 222—232.

[34] Cory J S. Assessing the risks of releasing genetically modified virus insecticides: progress to date[J] . Crop Protection, 2000, 19: 779—785.

[35] Smith C R, Kevin M H, Christopher G S. Impact of recombinant baculovirus field applications on nontarget heliothine parasitoid, microplitis croceipes (Hymenoptera: Braconidae) [J] . J Econ Entomol, 2000, 93(4): 1109—1117.