

杨尺蠖核多角体病毒的研究

IV. 病毒多角体的回收试验

王贵成 王志贤* 崔士英*

(中国林业科学研究院林业研究所)

摘 要

本文就杨尺蠖核多角体病毒的几种回收方法进行了比较。回收试验表明,以丙酮—乳糖(7.4—8.4%)共沉法回收 AciNPV 的多角体(PIB)是可行的。制备物的最终含量为 4.96×10^{10} PIB/g, 回收率平均达 80.5%。生物活性测定证明,回收的新鲜制备物,对 3 龄初幼虫的致病力是很好的。其 LC_{50} 及其 95% 的置信限分别为 2.84×10^3 PIB/ml 和 1.70×10^3 — 4.96×10^3 PIB/ml。

使用该程序,可省去昂贵的离心设备,在实验室一般设备的情况下,一次上样 1500—3000 g 病死虫,仅需 3 小时即可获得最终产品。配制的病毒制剂,可用于防治杨尺蠖 30—65 ha。大批量生产证明,该流程操作简便,省工省时,一次上样量较大,完全可以替代离心法,回收的成本也很便宜。

关键词 杨尺蠖; 核多角体病毒; 回收方法; 工艺流程

杨尺蠖(*Apocheima cinerarius*)核多角体病毒(简称 Aci NPV)的分离鉴定、活性测定及林间防治试验证明,该病毒对杨尺蠖幼虫的毒力较强,防治效果甚好^[1-3]。对影响病毒增殖的主要因素及室内外复制技术,已进行过较为详细的研究^[4]。但有关该病毒多角体的回收程序,国内外未见有任何报道^[6-10]。因此,为尽快给生产部门提供一套经济有效、操作简便、适合于大规模生产的回收程序,我们根据杨尺蠖核多角体病毒的病原特性,将 Dulmage 等回收 *Frichoplusia ni* NPV 的方法略加改进^[11],就 AciNPV 的几种回收程序进行了比较。现将 1982—1983 年所得结果报道如下。

一、材料与方 法

(一) AciNPV 病死虫的生产

AciNPV 病死虫的生产,按已确定的方法进行^[4]。回收试验所用的大量病毒,主要来源于内蒙古锡盟镶黄旗林场应用坝上毒株在林间复制的病死虫,平均含量为 1.74×10^{10} PIB/g。

本文于 1987 年 12 月 20 日收到。

* 仅参加了 1982 年的吸附试验及第 4 程序的部分试验。于在林、吴燕同志参与部分工作。

(二) 多角体的回收方法

多角体的回收方法主要有以下 3 种：离心—吸附法、离心与丙酮—乳糖共沉法、丙酮—乳糖共沉法。其多角体回收工艺流程见图 1。

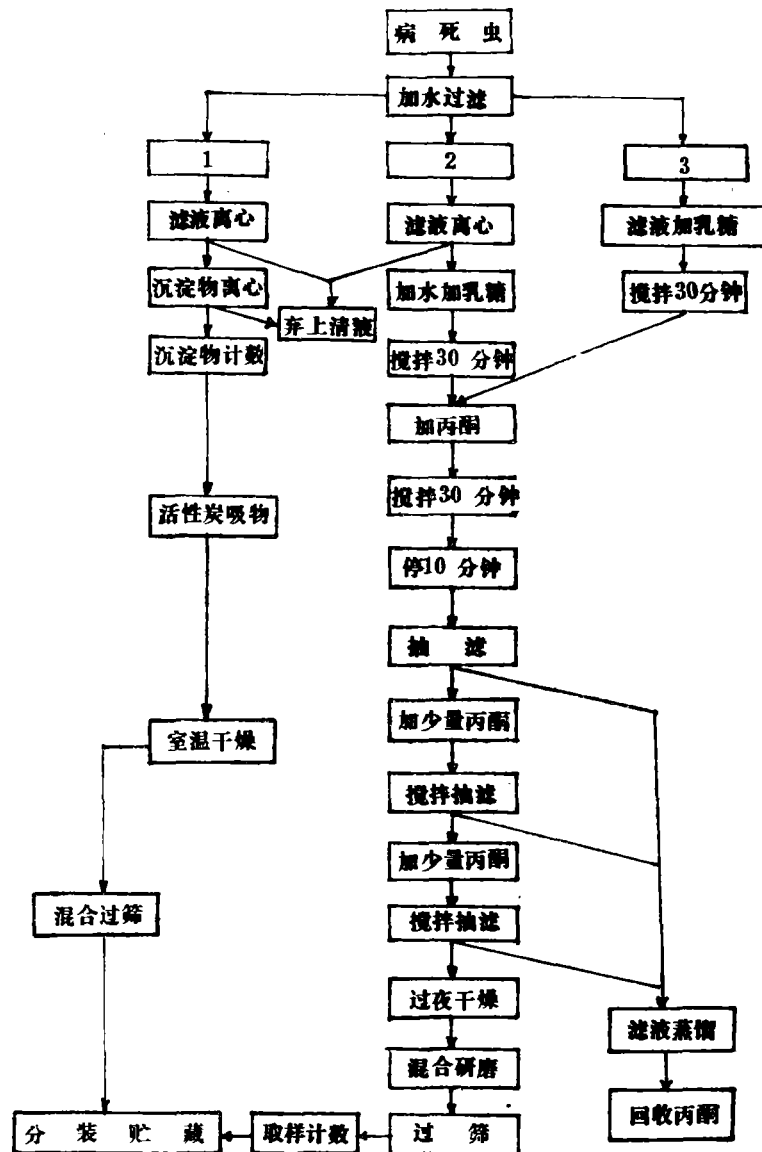


图 1 AcNPV 多角体回收程序示意图

根据回收方法的不同，每次各取 100g 病死虫，加适量蒸馏水稀释，搅拌混合后，经 121 目尼龙纱过滤，除去组织碎片及其他杂质。所得滤液再充分搅拌后，取 0.5ml 加无菌水稀释计数，然后按图 1 所列程序回收多角体，并计算其回收率及制备物中多角体含量，以比较其经济效益。

(三) 回收制备物的生物测定

多角体制备物的生物活性测定，仍按作者等已确定的方法进行^[2]。试验前，将多角体制备物稀释成 2.5×10^7 、 2.5×10^6 、 2.5×10^5 、 2.5×10^4 、 2.5×10^3 、 2.5×10^2 PIB/ml 6 种浓

度,以浸叶法感染3龄初杨尺蠖幼虫,每一浓度重复3次,并设有同样数量的未处理对照。当幼虫取食48小时后,更换新鲜食料,每日记载死亡数,10天全部结束,按常规数理统计方法计算 LC_{50} — LC_{90} 及其95%置信限。

二、结果与分析

(一) 多角体病毒的生产

在人工饲料尚未成功的情况下,作为AciNPV的生产,目前还只能以天然食料饲养幼虫,在室内外进行接毒感染增殖病毒^[4]。室内试验证明,接毒浓度以 1.1×10^6 PIB/ml或 1.1×10^7 PIB/ml为好,接毒虫龄以4龄初为最好(表1),平均含量为 2.64×10^9 PIB/幼虫。林间使用浓度以 2.5×10^6 PIB/ml为好,虫龄以2—3龄幼虫占85%左右为宜;3—4龄占85%左右时,应加大用量1倍^[3],但将有部分老熟幼虫下地化蛹。回收的病死虫,平均含量为 1.74×10^{10} PIB/g(表2)。

表1 接毒浓度、虫龄与AciNPV多角体产量的关系 (1982.4 北京)

| 接 毒 浓 度 (PIB/ml) | 接 毒 虫 龄 与 多 角 体 含 量(PIB/幼虫) | | |
|---------------------|-----------------------------|-------------------|--------------------|
| | 2 | 3 | 4 |
| 1.1×10^5 | — | — | 2.28×10^9 |
| 1.1×10^6 | 4.3×10^8 | 7.8×10^8 | 2.42×10^9 |
| 1.1×10^7 | — | — | 2.64×10^9 |

表2 林间回收AciNPV多角体含量测定* ($\times 10^{10}$ PIB/g)

| 组 距 | 组 中 值 (X) | 项 数 (F) | X F |
|-----------|-----------|---------|--------|
| 1.01—1.10 | 1.05 | 1 | 1.05 |
| 1.11—1.20 | 1.15 | 2 | 2.30 |
| 1.21—1.30 | 1.25 | 3 | 3.75 |
| 1.31—1.40 | 1.35 | 4 | 5.40 |
| 1.41—1.50 | 1.45 | 6 | 8.70 |
| 1.51—1.60 | 1.55 | 8 | 12.40 |
| 1.61—1.70 | 1.65 | 9 | 14.85 |
| 1.71—1.80 | 1.75 | 8 | 14.00 |
| 1.81—1.90 | 1.85 | 6 | 11.10 |
| 1.91—2.00 | 1.95 | 7 | 13.65 |
| 2.01—2.10 | 2.05 | 4 | 8.20 |
| 2.11—2.20 | 2.15 | 2 | 4.30 |
| 2.21—2.30 | 2.25 | 1 | 2.25 |
| 2.31—2.40 | 2.35 | 2 | 4.70 |
| 2.41—2.50 | 2.45 | 2 | 4.90 |
| 2.51—2.60 | 2.55 | 1 | 2.55 |
| 2.61—2.70 | 2.65 | 0 | 0.00 |
| 2.71—2.80 | 2.75 | 1 | 2.75 |
| Σ | | 67 | 116.85 |

$X = \Sigma XF / \Sigma F = 1.74$

* 每次以100g装,加灭菌水过滤稀释计数,所得结果。

(二) 多角体回收方法的比较

1. 离心—吸附法 从1982年开始,首先按图1内的第1程序从杨尺蠖病死虫中回收多角体病毒。回收前按1g湿重加水40ml稀释过滤,反复离心两次^[2],弃上清液,沉淀物加适量无菌水计数。根据沉淀物计数所得结果,仍按1:40稀释,加适量活性炭和粉煤灰吸附,使最终产品含量为 2.0×10^{10} PIB/g。尽管所配制剂防治效果良好^[3],但这种回收程序较复杂,一次上样量较少(仅40g病死虫),干燥时间较长(10天左右),产品成本较高,不能满足大规模生产的需要。因此,从1982年底开始,又按图1的第2—3回收程序,进行了多次比较试验。试验前按病死虫湿重1:3,加蒸馏水搅拌过滤,就两种程序所得产品进行比较。

2. 离心与丙酮—乳糖共沉法 此方法的程序是以国产LXJ-II型离心机(上海医用分析仪器厂出品)4000转离心30分钟,弃上清液。沉淀物重新悬浮于15%的乳糖液中,搅拌30分钟,边搅拌边加入600ml工业丙酮,搅拌30分钟,停10分钟抽滤。于沉淀物中再加少量工业丙酮,搅拌10分钟抽滤,接着重复一次,得干粉26.8g,含量为 4.0×10^{10} PIB/g,回收率为61.1%。但每次的回收率均不稳定,平均含量较低。

3. 丙酮—乳糖共沉法 该方法的程序是将28—32克乳糖直接加入380ml滤液内,以D90—2型电动搅拌机(杭州仪表电机厂出品)搅拌30分,加3倍体积的工业丙酮1140ml,搅拌30分钟抽滤。于制备物中再加少量工业丙酮,搅拌10分钟抽滤。接着以同样方法重复一次,过夜干燥,得干粉制备物35g左右,平均含量为 4.96×10^{10} PIB/g(表3),回收率达80.5%(表4)。虽然第3程序回收的多角体制备物是一种低纯度的产品,但省去了离心步骤,可以节约很多时间。而且这一程序设备比较简单,便于大规模生产。在实验室条件下,一次上样量高达1500—3000g病死虫,3小时回收干粉500—1000g,可用于防治杨尺蠖30—60ha,

而且所用丙酮还可回收70%左右。因此,后来用于野外大面积地面喷洒或空中飞机喷洒的制剂产品,都是以第3流程回收的多角体制备物配制的,防治效果达85%以上。

表3 丙酮—乳糖共沉法回收AciNPV
制备物多角体含量测定 ($\times 10^{10}$ PIB/g)

| 组距 | 组中值(X) | 项数(F) | XF |
|---|----------|-------|--------|
| 2.51—3.00 | 2.75 | 1 | 2.75 |
| 3.01—3.50 | 3.25 | 3 | 9.75 |
| 3.51—4.00 | 3.75 | 5 | 18.75 |
| 4.01—4.50 | 4.25 | 2 | 8.50 |
| 4.51—5.00 | 4.75 | 5 | 23.75 |
| 5.01—5.50 | 5.25 | 3 | 15.75 |
| 5.51—6.00 | 5.75 | 1 | 5.75 |
| 6.01—6.50 | 6.25 | 3 | 18.75 |
| 6.51—7.00 | 6.75 | 2 | 13.50 |
| 7.01—7.50 | 7.25 | 3 | 21.75 |
| | Σ | 28 | 139.00 |
| $\bar{X} = \Sigma XF / \Sigma F = 4.96$ | | | |

表4 丙酮—乳糖共沉法回收AciNPV
多角体的收率测定

| 组距 | 组中值(X) | 项数(F) | XF |
|-----------------------------------|----------|-------|------|
| 51—60 | 55 | 0 | 0 |
| 61—70 | 65 | 4 | 260 |
| 71—80 | 75 | 6 | 450 |
| 81—90 | 85 | 8 | 680 |
| 91—100 | 95 | 4 | 380 |
| | Σ | 22 | 1770 |
| $X = \Sigma XF / \Sigma F = 80.5$ | | | |

(三) 多角体制备物的活性测定

丙酮—乳糖共沉多角体制备物的活性测定结果列入表5。根据表5计算所得直线回归方

程及其函数图象如图 2 所示, 可见观察值与计算值较为接近。其 LC_{50} 为 2.84×10^3 PIB/ml,

95%置信限在 $1.70 \times 10^3 - 4.96 \times 10^3$ PIB/ml 之间(表 6), 比提纯离心样品个体生测结果要高^[2]。使用第 3 流程回收的多角体配制的各种制剂, 经 3 年的贮藏试验和多年的林间试验表明, 防效均在 85% 以上(表 7)。与提纯离心制剂相比, 防治效果相差不大^[3]。

表 5 回收 AciNPV 制备物的活性测定结果

(内蒙古 1983.5)

| 感染浓度 (PIB/ml) | 供试 幼虫数 | 感染死亡率 (%) | 校正死亡率 (%) | 机率值 (Y) |
|-------------------|-----------|--------------|--------------|------------|
| 2.5×10^6 | 61 | 100.0 | 100.0 | — |
| 2.5×10^5 | 64 | 96.8 | 96.7 | 6.88 |
| 2.5×10^4 | 57 | 67.5 | 66.4 | 5.41 |
| 2.5×10^3 | 51 | 50.9 | 49.3 | 4.97 |
| 2.5×10^2 | 69 | 24.8 | 22.0 | 4.23 |

表 6 感染 3 龄初幼虫死亡 30—90% 所需浓度及其 95% 置信限

| 死亡率 (%) | 感染浓度 (PIB/ml) | 95% 置信限 | |
|------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | 下 限 | 上 限 |
| 30 | 6.81×10^2 | 3.83×10^2 | 1.20×10^3 |
| 50 | 2.84×10^3 | 1.70×10^3 | 4.96×10^3 |
| 70 | 1.19×10^4 | 7.28×10^3 | 1.93×10^4 |
| 90 | 9.57×10^4 | 4.57×10^4 | 2.00×10^5 |

表 7

应用 AciNPV 杀虫剂防治杨尺蠖效果

| 试验地点 | 制剂名称 | 喷洒方式 | 喷洒浓度 (PIB/ml) | 喷洒剂量 (PIB/亩) | 防治面积 (亩) | 龄 期 | 标准枝虫口密度 | | |
|----------------|---------|--------|--------------------|-----------------------|-------------|-----|---------|-----|------------|
| | | | | | | | 防 前 | 防 后 | 下降率 (%) |
| 内 蒙 古 | TOV-824 | 超低容量全喷 | 1.21×10^8 | 1.35×10^{10} | 33 | 2-3 | 22.2 | 1.3 | 94.1 |
| | TOV-834 | 超低容量全喷 | 1.67×10^8 | 2.50×10^{10} | 28 | 2-3 | 22.2 | 0.7 | 96.8 |
| 镶黄旗林场 | BWV-831 | 高容量隔带喷 | 2.50×10^6 | 1.83×10^{10} | 205 | 3-4 | 22.7 | 0.9 | 96.0 |
| | BWV-832 | 高容量隔带喷 | 2.50×10^6 | 2.50×10^{10} | 160 | 3-4 | 38.4 | 1.6 | 95.5 |
| 内 蒙 古 | BWV-831 | 高容量隔带喷 | 2.50×10^6 | 2.50×10^{10} | 5 | 3-4 | 21.6 | 3.0 | 86.5 |
| 商 都 县 | BWV-832 | 高容量隔带喷 | 2.50×10^6 | 2.50×10^{10} | 5 | 3-4 | 4.6 | 0.8 | 85.0 |
| 八股地林场 | BWV-833 | 高容量隔带喷 | 2.50×10^6 | 2.50×10^{10} | 5 | 3-4 | 18.0 | 2.0 | 83.3 |
| 甘肃省武威地区石洋河林业总场 | BWV-831 | 低容量全喷 | 2.50×10^6 | 2.50×10^{10} | 150 | 3-4 | 27.3 | 2.5 | 90.8 |
| | BWV-833 | 低容量全喷 | 2.50×10^6 | 2.50×10^{10} | 150 | 3-4 | 27.9 | 1.9 | 93.2 |

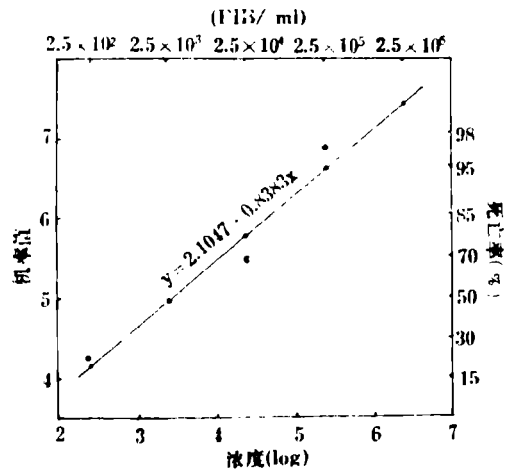


图 2 感染浓度与死亡率回归直线

三、结语与讨论

通过几种回收工艺流程的比较, 我们认为丙酮-乳糖共沉法较好。因其不需要复杂的离心设备, 操作简便, 省工省时, 适合大规模生产的需要, 便于各级森林病虫害防治站就地取材, 就地加工成产品。与 Dulmage 等回收 *Trichoplusia ni* NPV 方法比较^[11], 减少了丙酮用量,

节约费用 1/4, 因此降低了 AcNPV 杀虫剂的生产成本。所得病毒干粉体积小, 便于贮存, 可根据需要随时配成各种剂型。特别是解决了油剂配制问题, 其意义更为重大。

回收的多角体制备物及其所配制剂, 经贮藏试验和多年林间防治试验证明, 防治效果甚好, 而且是低成本的。尽管丙酮—乳糖共沉多角体制备物与新鲜样品比较, 在贮藏过程中会丧失一些活性, 但这是微不足道的。只要掌握好防治适期, 并不影响整体防治效果, 只是潜伏期延长 1 天左右(有关材料另文报道)。所以我们认为, 这种回收流程还是可取的, 是比较适合我国目前生产水平的。

参 考 文 献

- [1] 王志贤等, 1982, 杨尺蠖核型多角体病毒的初步研究, 微生物学通报, 9(5): 204—214。
- [2] 王贵成等, 1983, 杨尺蠖核多角体病毒的研究 I. 病毒的活性测定, 《林业科学》昆虫专辑, 37—41。
- [3] 王贵成等, 1983, 杨尺蠖核多角体病毒的研究 II. 林间防治试验效果, 《林业科学》昆虫专辑, 42—48。
- [4] 王贵成等, 1988, 杨尺蠖核多角体病毒的研究 III. 病毒的增殖及活性测定, 林业科学, 23(2)。
- [5] 吕鸿声著, 1982, 昆虫病毒与昆虫病毒病, 科学出版社出版, 1—645。
- [6] 梁东瑞等, 1983, 两种提取菜粉蝶颗粒病毒方法的比较, 微生物学报, 10(3): 138—140。
- [7] 刘岱岳, 1983, 开发昆虫天敌病毒用于防治, 生物防治(五), 科学技术文献出版社重庆分社出版, 12—30。
- [8] Kurstak, E. (Ed.), 1982, Microbial and viral pesticides, Marcel Dekker, Inc. New York and Basel. 463—492.
- [9] Burges, H. D. (Ed), 1981, Microbial control of pests and plant diseases 1970—1980, Academic press (London), 313—464.
- [10] Doane, C. C. (Eds.), 1981, The gypsy moth: Research towards integrated pest management, U. S. Dep. Agric., Washington, D. C., 633—655.
- [11] Dulmage, H. T. et al., 1970, Recovery of the nuclear polyhedrosis virus of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, by coprecipitation with lactose, J. Invertebr. Patho., 16:80—83.

A STUDY ON THE NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS OF THE POPLAR LOOPER (*APOCHEIMA CINERARIUS*) IV. RECOVERY TESTS OF VIRUS

Wang Guicheng Wang Zhixian Cui Shiyang

(The Research Institute of Forestry CAF)

Abstract

Several methods for recovery procedure of the polyhedral inclusion bodies of nuclear polyhedrosis virus of the poplar looper, *Apocheima cinerarius*, were compared. Recovery tests indicated that the PIB of AcNPV were precipitated from the concentrated suspensions in 7.4—8.4% solutions of lactose by adding

acetone. Counts of the final preparation showed 4.96×10^{10} PIB/g. Yields of 80.5% were obtained. Bioassay tests indicated that the pathogenicity of the fresh preparations recovered was very good for the early third-instar larvae. The LC_{50} and 95% fiducial limits are 2.84×10^3 PIB/ml and $1.70 \times 10^3 - 4.96 \times 10^3$ PIB/ml respectively.

In this procedure, costly centrifugal equipment was omitted, 1500—3000g diseased larvae could be reduced to final production in 3hr with laboratory general equipment. In this case, the virus formulation prepared may be used to control the poplar looper larvae in about 30—65 ha in the forest. Mass production has been proved to be a useful replacement for the centrifugation method, and the cost of the recovery virus is cheap.

Key words: *Apocheima cinerarius*; nuclear polyhedrosis virus; recovery tests; recovery procedure

ABT生根粉全国推广、总结、 表彰大会在北京召开

ABT生根粉全国推广、总结、表彰大会于1987年10月29日至11月1日在北京召开。参加会议的有18个省、市、区的代表共40人，其中专业户6人。会议期间，中国林科院副院长陈统爱、北京市人民政府计划委员会副主任曹学坤、北京林业大学教授孙时轩，国家科委农村技术开发中心、林业部科技司、北京市林业局、北京市农林科学院派员参加会议并讲了话。有关新闻单位也出席了会议。

会议听取了林研所副研究员王涛同志关于三年来ABT生根粉推广总结报告。她肯定了生根粉是一种广谱、高效生根促进剂，它不仅能补充植物所需要的外流生根素，还能促进插穗内流生长素的合成。因而能加速插穗下切口愈合，缩短生根时间。ABT生根粉1984年底进入科技市场后，受到各方欢迎。目前，已在全国26个省、市、区4000个单位进行了推广试验工作，建立了全国性的推广、试验、销售技术和咨询服务四位一体的协作网。试验植物由几种推广到289种，根据22个省，981个点，848.6万株扦插苗的调查，应用生根粉能促进植物插条生根，平均生根率为94%。其中花卉85种，平均生根率为92%；果树及特种经济树种114种，平均生根率为96%；树木90种，生根率为97%。对难生根的柿树、荔枝、板栗等的扦插育苗，取得重大进展。还突破了红松、鱼鳞松、山杨扦插生根难的大关。近几年来，用于水稻、玉米、马铃薯、西红柿以及人参等品种上，生根率提高10—30%。由于ABT生根粉能显著提高生根率，因此推广应用生根粉已取得明显经济效益，三年来为国家创纯收益700多万元。

会议期间，有33个单位交流了经验，山东省寿光县振兴葡萄园艺场张本敬介绍了利用生根粉培育各种葡萄苗，已取得百万元的经济效益，还为全国20个省、市培训了6万多人次的致富人才；吉林省汪清县林业局郑麟模介绍了人参和水稻利用生根粉，获得大幅度增产的经验。这些，都博得与会同志的赞赏。

会议经过充分讨论，制定了1988年生根粉推广、试验计划。会上对39名推广生根粉的先进工作者颁发了荣誉证书及奖品。还宣布成立植物扦插研究会、植物扦插繁殖科技通讯编辑部 and 植物工厂化育苗综合技术研究推广协作组。

(林茂)