

# 杨尺蠖核型多角体病毒增殖技术的研究\*

吴 燕 王贵成

(中国林业科学研究院森林生态环境及保护研究所, 100091, 北京; 第一作者 30 岁, 女, 实验师)

关键词 杨尺蠖; 核型多角体病毒; 增殖

分类号 S718.85

昆虫病毒是一种很好的生物杀虫剂, 其特异性强, 致病力高, 安全、不污染环境。目前国外已有 30 多种昆虫病毒杀虫剂进行了登记、注册、生产和应用<sup>[1]</sup>。然而如何解决病毒的增殖技术和降低生产成本, 是病毒商品化生产的重要问题。虽然细胞大规模培养生产病毒杀虫剂的研究发展很快, 但受到产量和成本的困扰以及其它的一些问题, 距商品化生产尚有一定距离<sup>[2]</sup>。目前昆虫病毒杀虫剂多采用天然食料田间接毒感染和人工饲料接毒感染增殖病毒。在此方面世界各国已有许多成功的实例<sup>[3]</sup>。从 1985 年开始, 作者等对杨尺蠖 (*Apoccheima cinerarius* Erchff) 人工饲料连续饲养技术及病毒的增殖进行了初步探索, 并取得了突破性进展<sup>[4~8]</sup>。但直到目前为止, 有关这方面的研究工作未见报道。现将试验结果报道如下。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试幼虫

供试幼虫以干酪素-麦胚为主的 10 号混合人工饲料饲养在塑料瓶内, 温度控制在  $22 \pm 1$ , 当幼虫进入 3~4 龄时, 供试验用。

### 1.2 供试病原及浓度

1.2.1 病原 试验用 AciNPV 均系河北坝上毒株经室内重新增殖, 置  $-20$  低温冰箱内保存备用。

1.2.2 浓度 将病毒分离提纯, 用  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 PBS 青、链霉素 ( $500 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 溶液稀释成  $2.5 \times 10^6$ 、 $2.5 \times 10^7$ 、 $2.5 \times 10^8 \text{ PIB} \cdot \text{mL}^{-1}$  3 种浓度, 供室内感染各龄幼虫用。

### 1.3 增殖方法与条件

各项试验均以人工饲料表面定量接毒, 每个小罐头瓶 (250 mL) 接毒量为  $0.5 \text{ mL} \cdot \text{瓶}^{-1}$  (约为  $0.016 \text{ mL} \cdot \text{cm}^{-2}$ ), 并在超净工作台内吹干后, 每瓶接入 10 头幼虫, 置于  $18 \pm 1$ 、 $20 \pm 1$  生化培养箱内恒温饲养。

## 2 结果与分析

### 2.1 感染浓度与病毒增殖量的关系

在初选的基础上, 参考天然饲料饲养杨尺蠖增殖病毒的试验结果<sup>[4]</sup>, 并考虑到人工饲料饲养杨尺蠖, 其幼虫抗病力增强等因素, 因此在  $20$  恒温条件下, 设置 3 个浓度感染 4 龄初幼

\* 本文为“八五”国家科技攻关专题“杨尺蠖杆状病毒杀虫剂的研制及应用技术的研究”的内容之一。  
1998-06-25 收稿。

虫。结果表明(见表 1),其感病死亡率随浓度升高而增加。以  $2.5 \times 10^6$  PIB · mL<sup>-1</sup> 感染 4 龄初幼虫,其 LT<sub>50</sub> 为 8.84 d, 幼虫化蛹率为 8%, 死亡率为 92%, 多角体增殖总量为  $1.0 \times 10^{11}$  PIB, 平均含量为  $2.17 \times 10^9$  PIB · 头<sup>-1</sup>; 而以  $2.5 \times 10^8$  PIB · mL<sup>-1</sup> 感染 4 龄初幼虫, LT<sub>50</sub> 为 5.67 d, 死亡率达 100%。但由于幼虫感病潜伏期短, 多角体增殖总量为  $5.31 \times 10^{10}$  PIB, 平均含量仅为  $9.48 \times 10^8$  PIB · 头<sup>-1</sup>。由此证明, 感染浓度以  $2.5 \times 10^6$  PIB · mL<sup>-1</sup> 为好。

表 1 感染浓度与病毒增殖量的关系

感染浓度/ PIB · mL <sup>-1</sup>	供试幼 虫/头	感染死亡 率%	化蛹率 %	回收死虫 /g	每虫平均 /g · 头 <sup>-1</sup>	多角体增殖 总量/PIB	平均含量 /PIB · 头 <sup>-1</sup>	LT <sub>50</sub> /d
$2.5 \times 10^6$	50	92	8	5.35	0.12	$1.00 \times 10^{11}$	$2.17 \times 10^9$	8.84
$2.5 \times 10^7$	56	98	2	4.95	0.09	$8.86 \times 10^{10}$	$1.61 \times 10^9$	8.80
$2.5 \times 10^8$	56	100	0	3.00	0.05	$5.31 \times 10^{10}$	$9.48 \times 10^8$	5.67

## 2.2 感染龄期与增殖量的关系

在 20℃ 恒温条件下, 以同一浓度( $2.5 \times 10^6$  PIB · mL<sup>-1</sup>) 感染 3、4 龄初幼虫。其结果表明(见表 2), 病毒增殖量随感染龄期的增加而提高, 4 龄初幼虫的增殖量约为 3 龄幼虫的 3.5 倍, 平均死虫质量为  $0.131$  g · 头<sup>-1</sup>, 单头含量为  $2.43 \times 10^9$  PIB · 头<sup>-1</sup>, 而 3 龄只有  $6.98 \times 10^8$  PIB · 头<sup>-1</sup>, 平均死虫质量也明显低于 4 龄。由此可见, 就感染龄期而言, 以 4 龄初为宜。

表 2 感染虫龄与病毒增殖量的关系

龄期/龄	供试幼虫 /头	感染死亡 率%	化蛹率%	回收死虫 /g	每虫平均 /g · 头 <sup>-1</sup>	多角体增殖 总量/PIB	平均含量 /PIB · 头 <sup>-1</sup>
3	45	100	0	1.80	0.04	$3.14 \times 10^{10}$	$6.98 \times 10^8$
4	51	90.2	9.8	6.15	0.13	$1.12 \times 10^{11}$	$2.43 \times 10^9$

## 2.3 感染温度与增殖量的关系

温度是影响病毒增殖的重要因子, 温度升高幼虫历期缩短。在 22℃ 条件下, 平均幼虫历期为 14~15 d, 4 龄幼虫接毒后仅发育 6~7 d 即可化蛹, 因此病毒回收量很少, 而低于 18℃ 则幼虫发育速度太慢, 回收量较少。综合上述因素, 将温度设置在 18~20℃ 范围内, 以  $2.5 \times 10^6$  PIB · mL<sup>-1</sup> 浓度, 感染 4 龄初幼虫。结果表明(见表 3), 在 20℃ 条件下, 无论是感染死虫的平均质量或是单头平均含量都略高于 18℃。虽然温度升高, 幼虫发育速度加快, 相对的化蛹率略高, 但缩短了感染死亡时间, 其 LT<sub>50</sub> 仅为 8.27 d, 比 18℃ 增殖提前 1.28 d。两者比较而言, 以 20℃ 感染 4 龄初幼虫较为适宜, 18℃ 亦可。

表 3 温度对病毒增殖量的影响

温度 /℃	供试幼虫 /头	感染死亡 率%	化蛹率%	回收死虫 /g	平均质量 /g · 头 <sup>-1</sup>	多角体增殖 总量/PIB	平均含量 /PIB · 头 <sup>-1</sup>	LT <sub>50</sub> /d
18±1	51	92.2	7.8	5.20	0.11	$1.13 \times 10^{11}$	$2.40 \times 10^9$	9.55
20±1	51	90.2	9.8	6.15	0.13	$1.12 \times 10^{11}$	$2.43 \times 10^9$	8.27

## 3 结 语

综上所述, 本文着重就影响人工饲料饲养增殖杨尺蠖核型多角体病毒的有关因子进行了

初步研究。试验结果表明,其病毒增殖量与使用浓度、虫龄大小及温度等密切相关。感染浓度以  $2.5 \times 10^6$  PIB  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 为宜,感染龄期以4龄初、温度为20℃为好,18℃条件下亦可。其单头含量为  $2.40 \times 10^9 \sim 2.43 \times 10^9$  PIB。值得一提的是,由于幼虫的饲养环境及饲料发生了变化,单位面积接毒量就显得特别重要,也是影响病毒增殖的重要因素,这与天然饲料饲养有很大的区别。人工饲料饲养杨尺蠖幼虫的成功,为 AciNPV 的工业化生产开辟了一条新的途径。

### 参 考 文 献

- 1 梁东瑞.我国害虫病毒生物防治的进展.杀虫微生物(第三卷).北京:华中师范大学出版社,1991.40~45.
- 2 洪华珠,杨红.病毒杀虫剂的发展.中国生物防治,1995,11(2):84~88.
- 3 Shapiro M. In: Granads R R, Federici B A (eds). The Biology of Baculoviruses (Vol. 1). Boca Raton: CRC Press Inc., 1989. 31~61.
- 4 王贵成,王志贤,崔士英.杨尺蠖核多角体病毒的研究.病毒的增殖及活性测定.林业科学,1988,24(2):170~176.
- 5 王贵成,王志贤,崔士英.杨尺蠖核多角体病毒的研究.病毒多角体的回收试验.林业科学研究,1988,1(2):162~168.
- 6 王贵成,王志贤,崔士英,等.杨尺蠖核多角体病毒的研究. AciNPV 杀虫剂的研制及产品检测.林业科学研究,1988,1(5):508~515.
- 7 王贵成,于在林,佟守元.杨尺蠖核多角体病毒的研究.病毒的贮藏效果.林业科学研究,1989,2(5):427~432.
- 8 王贵成,于在林,吴燕.杨尺蠖核多角体病毒的研究. AciNPV 杀虫剂的防治效果.林业科学研究,1994,7(1):170~176.

## A Studies on the Technology of Propagation of the Nuclear Polyhedrosis Virus of the Poplar Looper, *Apocheima cinerarius*

Wu Yan Wang Guicheng

(The Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, CAF, 100091, Beijing, China)

**Abstract** This paper deals with the study on the main factors, such as the infection concentration, infection instar and temperature, affecting the propagation of the Nuclear Polyhedrosis Virus (NPV) of poplar looper, *Apocheima cinerarius*, the artificially reared 3~4 instars larvae were fed with the surface inoculated medium and it proved that the optimal concentration is  $2.5 \times 10^6$  PIB  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> on condition that the temperature is 20℃. The result showed that the 4-instar larvae were the best for inoculation. The average propagating total of polyhedral inclusion bodies (PIB) is  $2.40 \times 10^9 \sim 2.43 \times 10^9$  PIB.

**Key words** *Apocheima cinerarius*; Nuclear Polyhedrosis Virus; propagation