

单头饲养斜纹夜蛾增殖 SINPV 病毒的研究*

黄亚欣

(中山大学昆虫学研究所/生物防治国家重点实验室 广州 510275)

摘要 使用人工半合成饲料大规模单头饲养斜纹夜蛾幼虫,增殖核型多角体病毒.通过不同接种浓度、接种龄期、饲养温度以及不同饲料的比较,筛选出当 3 龄幼虫接种的病毒浓度为 3.85×10^5 PIBs/mL,4 龄幼虫接种的病毒浓度为 3.85×10^7 PIBs/mL 时,病毒产量最高,4 龄幼虫接种增殖病毒的最适温度为 $24 \sim 27^\circ\text{C}$,人工半合成饲料饲养幼虫增殖病毒效果优于天然饲料.同时,罹病虫尸的重量与其病毒产量之间,有显著的线性关系;罹病虫的死亡速率与饲虫温度成正比.

关键词 斜纹夜蛾,核型多角体病毒,增殖

分类号 Q965.8

病毒增殖是病毒杀虫剂大规模生产的重要环节之一.目前,由于利用细胞培养大量增殖病毒成本太高,不适于病毒杀虫剂的大规模生产.国内外普遍采用人工半合成饲料大量饲养寄主昆虫增殖病毒的方法,生产病毒杀虫剂^[1~8].影响病毒增殖产量的因素可归结为品系、虫龄和性比;饲养容器、饲料、温度、湿度和光照等条件;病毒株、接种浓度、收获病毒的时间和方法等三个方面^[3].筛选适宜病毒增殖的最佳组合条件,国内外迄今为止均采用病毒产量为标准,以获得最高病毒产量的组合条件^[1~6].蒲蛰龙等的研究^[6]表明,斜纹夜蛾(*Spodoptera litura* F.)幼虫有自相残杀的习性,尤其是核型多角体病毒(nuclear polyhedrosis virus)罹病虫更为严重,当群体饲养时会造成病毒产量的大量损失.本研究在此基础上,首次采用单头饲养幼虫的方法增殖病毒,旨在为斜纹夜蛾核型多角体病毒(简称 SINPV)杀虫剂的大规模生产研究提供重要依据.

1 材料和方法

供试斜纹夜蛾为中山大学昆虫学研究所人工半合成饲料连续饲养 15 代以上的品系. SINPV 毒株为中山大学昆虫学研究所分离提纯的标准样品.

人工半合成饲料根据庞义等^[7]配方配制,分装备用.天然饲料选用蓖麻叶,浸泡于

收稿日期:1993-10-23

* 国家“七·五”科技攻关资助项目

5%福尔马林溶液中消毒 30min,冲洗干净,凉干,再置紫外光下消毒 30min,剪成面积约为 4.5cm² 的小片,备用。

卵块消毒方法为在孵化前一天,用 5%(v/v)福尔马林溶液将卵块浸泡 30min,用无菌蒸馏水冲洗 3~5 次、置超净工作台上吹干后,移入盛有人工半合成饲料的圆形塑料盒(13cm×3.5cm)中央,每盒接入 2~3 个卵块(约 500~800 粒),饲养至接种龄期,再移入单头饲养容器(φ 3cm×7cm)内单头饲养。每日观察,收获病虫尸,称重,然后匀浆 15min,稀释,血球计数器计数。

(1) 接种浓度与接种虫龄的组合对病毒增殖的影响。以 3.85×10^3 , 3.85×10^4 , 3.85×10^5 , 3.85×10^6 , 3.85×10^7 , 3.85×10^8 PIBs/mL 6 种不同浓度的病毒多角体悬浮液,滴加在人工半合成饲料表面,每头虫接种剂量为 100μL,对照组加 100μL 无菌蒸馏水。置超净工作台上吹干水份。饲毒虫龄分别为 3 龄、4 龄和 5 龄,每处理 30 头虫,不设重复,共 21 个处理。饲虫温度为(25±1)℃。

(2) 温度与接种虫龄的组合对病毒增殖的影响。设 21, 24, 27, 30, 33, 36℃ 6 种不同温度处理 接种龄期为 4 龄初和 4 龄末两组,接种浓度为 3.85×10^7 PIBs/mL,每头虫 100μL;每个温度处理设一空白对照。每处理 30 头虫,置复式温箱内,温度误差为±1℃。

(3) 人工半合成饲料和天然饲料的组合对病毒增殖的影响。将 100μL 浓度为 3.85×10^6 和 3.85×10^7 PIBs/mL 的病毒悬浮液,滴于小片蓖麻叶表面,超净工作台上吹干水份,用其饲虫 24h 后换无毒叶。同时将 100μL 浓度为 3.85×10^7 PIBs/mL 的病毒悬浮液接种于每个单头饲养容器中的人工半合成饲料表面。每处理 30 头虫,各设一对照。接种龄期为 4 龄末,温度为(24±1)℃。

以上 3 组试验处理的光照均为每日 12h,相对湿度为 60%~80%。

2 结果和分析

2.1 接种浓度与接种虫龄的组合对病毒增殖的影响

不同接种浓度和接种虫龄的组合对病毒增殖有显著影响,结果如表 1。

表 1 虫龄、饲养浓度(c)不同组合对病毒增殖的影响

Tab. 1 The effect on propagating SINPV of different combinations of six virus concentrations with three inoculating instars /亿 PIBs

c/PIBs · mL ⁻¹	3.85×10^2			3.85×10^4			3.85×10^5			3.85×10^6			3.85×10^7			3.85×10^8			0		
	E	G	M	E	G	M	E	G	M	E	G	M	E	G	M	E	G	M	G	M	
3 龄	3.9	43.9	37	39.8	37	4.7	87.4	77	3.4	94.4	90	3.6	82.3	77	1.4	48.8	96	0	0	0	
4 龄	1.9	36.2	53	2.4	53.8	73	3.8	79.8	77	3.8	86.3	77	5.6	167	100	4.5	134.3	100	0	0	
5 龄				2.3	23.3	11				1.4	11.1	27	0	0	0	1.4	24.9	60	0	0	

E:每头幼虫平均产量;G:每处理(30 头)总产量;M:每处理中的病虫死亡率(%),经过 Abbott 公式校正。下面表格中标注均同

3 龄幼虫接种,在接种浓度为 3.85×10^5 PIBs/mL 时,平均每头幼虫病毒产量及每处理病毒总产量均为最高,分别为 47 亿 PIBs 和 1074 亿 PIBs。4 龄幼虫接种的病毒产量,以

3.85×10^7 PIBs/mL 最高,平均每头虫产量可达 56 亿 PIBs,每处理总产量达 1672 亿 PIBs. 接种浓度为 3.85×10^5 PIBs/mL 时,平均每头虫产量可达 58 亿 PIBs,但由于死亡率仍为 44%,低于前者的 100%,所以总产量亦低于前者. *t* 检验,4 龄幼虫接种病毒获得的最高产量(平均每头虫产量和每处理总产量)均显著高于 3 龄幼虫接种病毒获得的最高产量.

将 3 龄和 4 龄接种的幼虫感染病毒致死的虫尸的平均重量(w)与其所含的病毒多角体产量(N)进行回归分析,结果虫重(g)与病毒数量(PIBs)呈显著直线相关. 3 龄接种时的相关系数 $r=0.9534, P<0.01$; 4 龄接种时的相关系数 $r=0.9586, P<0.01$. 直线方程为:

$$3 \text{ 龄时: } N = 8.21w + 0.37 (\times 10^8 \text{ PIBs/mL})$$

$$4 \text{ 龄时: } N = 11.95w - 4.21 (\times 10^9 \text{ PIBs/mL})$$

这种线性关系说明,收获时虫尸越重,病毒产量越高.

实验结果中,出现高浓度感染,产量反而低的现象,可能是高浓度接种,幼虫很快就罹病死亡,这时虫体较小,产量不高;而接种浓度适中产量较高,则可能是幼虫罹病后,发病迟,死亡时虫体较重,病毒在虫体内得到较充分的增殖;而当浓度太低,可能由于虫体免疫系统作用的结果,死亡率不高,病毒未能得到充分增殖的缘故. 这种现象油层与其它鳞翅目幼虫增殖病毒的研究结果相近似^[1,2,4,5]. 5 龄虫在接种浓度低于 3.85×10^7 PIBs/mL 时,幼虫存活率在 69%~93% 之间. 这与对照组比较无显著差异. 在接种浓度为 3.85×10^8 PIBs/mL 的高浓度下,幼虫存活率亦达 40%. 故认为,5 龄幼虫一般无病症出现,只有在浓度极高条件下,才有病症出现的可能. 镜检其蛹,均带有病毒多角体. 说明已被病毒潜伏性感染,但仍能继续生长发育.

2.2 温度与接种虫龄的组合对病毒增殖的影响

不同温度处理对病毒增殖有显著影响,试验结果如表 2 所示.

表 2 温度、虫期的不同组合对病毒增殖的影响

Tab. 2 The effect of propagating SINPV of different combinations of six rearing temperatures with two inoculating instars / 亿 PIBs

温度/(C)		21		24		27		30		33		36	
病毒产量		<i>E</i>	<i>G</i>	<i>E</i>	<i>G</i>	<i>E</i>	<i>G</i>	<i>E</i>	<i>G</i>	<i>E</i>	<i>G</i>	<i>E</i>	<i>G</i>
4 龄初	感染组	7.0	210.0	12.7	380.0	14.9	448.3	7.0	210.8	7.2	216.7	4.9	148.3
	对照组	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4 龄末	感染组	16.2	485.8	24.6	738.7	11.6	349.2	13.8	414.5	8.6	256.7	/	/
	对照组	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/	/

4 龄初接种的病毒产量峰值在 27°C,平均每头幼虫病毒产量为 14.9 亿 PIBs; 4 龄末接种的病毒产量最高值在 24°C,平均每头幼虫病毒产量为 24.6 亿 PIBs. 因采用 3.85×10^7 PIBs/mL 的高浓度接种,所有处理的死亡率均达到或接近 100%,故平均每头幼虫产量可与平均每处理总产量等价比较. Watanabe^[8]认为,高温阻遏多角体蛋白的合成,而不能形成多角体外壳. Ignoffo^[1]和 Thompson^[9]的研究也表明,适宜的温度能使病毒在寄主细胞内得到充分的增殖. 本试验的结果也证实了这一点,温度低于 24~27°C 区间的 21°C,平

均每头虫病毒产量为 7 亿 PIBs, 明显偏低, 可能是因为虫体此时发育速度较慢, 病毒不能充分增殖; 当温度高于 24~27℃ 区间时, 产量也显著减少, 说明高温抑制病毒在虫体内的增殖。

结果表明, 4 龄接种增殖病毒的适宜温区为 24~27℃。

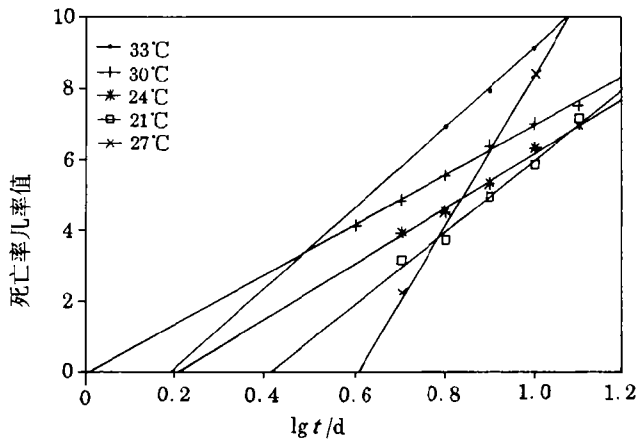


图 1 不同温度下 SINPV 感染斜纹夜蛾幼虫的 L-C-P 曲线

Fig. 1 The L-C-P curve after the larvae treated with SINPV in different temperatures

不同温度条件下病毒对 4 龄末幼虫的致死中时 (L_{50}) 计算结果为: 33℃ 时, 4.3d; 30℃ 时, 5.2d; 27℃ 时, 6.8d; 24℃ 时, 7.0d; 21℃ 时, 8.0d (如图 1)。说明温度越高, 死亡速率越快; 温度越低, 死亡速率越慢。经回归分析, 温度与不同温度下的致死中时相关非常显著 ($P < 0.01$)。故可认为, 温度与死亡速率呈正相关。

死亡速率的快慢直接影响到饲养幼虫必需的水电、劳务、饲料和养虫容器的周转等大规模生产的成本。因此在大规模生产的成本核算中, 我们可以通过将温度因素对增殖病毒的影响纳入与其它因素一起综合考查。

2.3 人工半合成饲料和天然饲料组合对病毒增殖的影响

试验结果如表 3 所示。

在接种浓度为 3.85×10^7 PIBs/mL 时, 人工半合成饲料组平均每头幼虫病毒产量和每处理病毒总产量均明显高于天然饲料组, 表明人工半合成饲料提供给虫体的营养, 在增殖病毒效果方面明显优于天然饲料蓖麻叶, 适宜于大规模生产病毒杀虫剂使用。当接种浓度为 3.85×10^8 PIBs/mL 时, 人工半合成饲料组平均每头幼虫病毒产量仍高于蓖麻叶组, 但每处理总产量却低于蓖麻叶组。这可能是由于天然饲料饲养的幼虫对病原体的抵抗力较弱; 而人工半合成饲料饲养的幼虫, 对病原体抵抗力较强的缘故。从蓖麻叶组病毒死率为 100%, 而人工半合成饲料组病毒死亡率为 77% 也可说明这点。

显然, 人工半合成饲料饲养的幼虫增殖病毒效果优于天然饲料蓖麻叶饲养的幼虫。同时应注意配合适宜的接种浓度。

表 3 天然饲料与工人半合成饲料单头饲养斜纹夜蛾对病毒增殖的影响

Tab. 3 The effect on propagating SINPV of an artificial diet with a natural diet /亿 PIB

接种浓度 /PIBs · mL ⁻¹	天然饲料(蓖麻叶)							
	3.85×10 ⁷		0		3.85×10 ⁸		0	
	<i>E</i>	<i>G</i>	<i>E</i>	<i>G</i>	<i>E</i>	<i>G</i>	<i>E</i>	<i>G</i>
病毒产量	24.7	741.4	20.0	220.0	33.9	1016.0	17.8	178.30
收获虫数	30		30		30		30	
病毒死虫数	30A [*]		11B		30A		10B	
接种浓度 /PIBs · mL ⁻¹	人工半合成饲料							
	3.85×10 ⁷		0		3.85×10 ⁸		0	
	<i>E</i>	<i>G</i>	<i>E</i>	<i>G</i>	<i>E</i>	<i>G</i>	<i>E</i>	<i>G</i>
病毒产量	56	1672	0	0	38	863	0	0
收获虫数	30		30		30		30	
病毒死虫数	30A		30A		0C		23	

* 后注相同字母大小写不同,差异显著($P < 0.05$);大小写相同,无显著差异;
不同字母,差异极其显著($P < 0.01$)

参 考 文 献

- 1 Ignoffo C M. The nuclear - polyhedrosis virus of *Heliothis zea*(Boddie)and *Heliothis virescens*(F.)I. Virus Propagation and Its Virulene. *Invert Pathol*, 1965, 7:206~216
- 2 Shapiro M. In the Gypsy Moth; Research Toward Integrated Pest Management. Edited by C. D. Doane and M. L. McIManus. USDA Tech Bull, 1981, 1584:633~655
- 3 Hedlund R C, Yendol W C. Gypsy moth nuclear - polyhedrosis virus production as related to inoculating time, dosage, and larval weight. *J Econ Ent*, 1974, 67:61~63
- 4 蔡秀玉. 棉铃虫核型多角体病毒增殖的研究. *动物学集刊*, 1981, 1:193~198
- 5 胡萃. 应用大菜粉蝶颗粒体病毒防治菜粉蝶的研究; 病毒的室内增殖. *浙江农业大学学报*, 1985, 11:129~133
- 6 蒲蛰龙. 昆虫病毒研究. 北京: 科学技术文献出版社, 1982
- 7 庞义. 斜纹夜蛾半合成人工饲料的改良. 中山大学昆虫学研究所昆虫学论文摘要. 1986
- 8 Watanabe H. Infection of a nuclear polyhedrosis virus in aryworm, *Pseudaletia unipuncta* H. (Lepidoptera; Nootuidae), reared at a high temperature. *Appl Ent Zool*, 1972, 7:43~51
- 9 Thompson C C. Thermal inhibition of certain polyhedrosis virus diseases. *J Insect Pathol*, 1959, 1:189~190

Studies on the Propagation of the Nuclear Polyhedrosis Virus of the Cotton Leafworm, *Spodoptera litura* F.

Huang Yazin *

Abstract This paper dealt with mass individual rearing the larvae of the cotton leafworm, *Spodoptera litura* F. on an artificial diet for propagating *S. litura* nuclear polyhedrosis virus (SINPV). The use of different combinations of six virus concentrations with three inoculating instars, six rearing temperatures with two inoculating instars and an artificial diet with a natural diet, to screen an optimal condition. The results showed that the maximal yield of SINPV was made when the larvae were treated with 3.85×10^5 PIBs/mL in 3rd instar and 3.85×10^7 PIBs/mL in 4th instar. The optimal temperature was $24 \sim 27^\circ\text{C}$ when the larvae were infected in 4th instar, and the yield of the SINPV was higher rearing the larvae in an artificial diet than in a natural diet. There was a linear correlation between the cadver weights and the SINPV yields respectively ($P < 0.01$). The mortality rate of the infected larvae was directly proportional to temperature.

Keywords *Spodoptera litura*, nuclear polyhedrosis virus, propagation

* Research Institute of Entomology, Zhongshan University, Guangzhou 510275