

苜蓿尺蠖核型多角体病毒对甜菜夜蛾的致病力和传播性研究

赵润洲¹, 徐艳玲^{1,2}, 秦利^{2*}, 张涛², 聂磊², 王玲玲²

(1. 河南科技学院 河南 新乡 453002; 2. 沈阳农业大学 生物科学技术学院 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 研究了苜蓿尺蠖核型多角体病毒 AcMNPV - AaIT 对甜菜夜蛾的致病力和传播流行性。结果表明: AcMNPV - AaIT 对甜菜夜蛾有较高的毒力, 温度对毒力有很大的影响, 在 17℃ 与 23℃ 的条件下, LC₅₀ 分别为 10^{4.56}, 10^{5.92} PIB/mL; 感病幼虫的尸体容易腐烂流脓, 且脓汁内含有大量病毒。低温贮藏对该病毒的毒力没有明显影响, 说明 AcMNPV - AaIT 有较好的传播流行性, 是一种理想的生防病毒。

关键词: 甜菜夜蛾; 苜蓿尺蠖核型多角体病毒; 致病力; 流行性

中图分类号: S436.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 3268(2007)06 - 0074 - 03

The Pathogenicity and Prevalence of AcMNPV to *Spodoptera exigua*

ZHAO Run zhou¹, XU Yan ling^{1,2}, QIN Li^{2*}, ZHANG Tao², NIE Lei², WANG Ling ling²

(1. Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453002, China;

2. College of Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: The pathogenicity and prevalence of AcMNPV to *Spodoptera exigua* was studied in the paper. The results showed that the AcMNPV - AaIT had high virulence to *Spodoptera exigua*. The influence of temperature on toxicity of AcMNPV - AaIT was significant. At 17℃ and 23℃, the LC₅₀ of AcMNPV - AaIT to *Spodoptera exigua* larvae was 10^{4.56} and 10^{5.92} PIB/mL, respectively. The dead insects infected by the AcMNPV - AaIT were decayed and suppurated easily and the pus contained a mass of virus. The toxicity of AcMNPV - AaIT stored at 4℃ was not obviously changed. This suggested that the AcMNPV - AaIT has fairly good propagation and is a hopeful virus for biological control.

Key words: *Spodoptera exigua*; AcMNPV - AaIT; Pathogenicity; Prevalence

甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)属鳞翅目夜蛾科, 是一种迁飞性强、间歇爆发危害的世界性害虫^[1]。在我国主要寄主有 14 科 41 种以上, 在豫北常年发生 5~6 代, 世代重叠, 主要危害甜菜、苜蓿、白菜、青菜(小白菜)、卷心菜、萝卜、胡萝卜、苋菜、菠菜等多种蔬菜, 近年来的发生和危害逐年加

重, 经常爆发成灾, 已逐步上升为玉米、棉花、高粱、小麦等主要大田作物的重要害虫^[2]。苜蓿尺蠖核型多角体病毒(AcMNPV)是一种从苜蓿尺蠖蛾中分离出的一株多包埋体的昆虫杆状病毒, 宿主范围非常广泛, 能感染 30 多种鳞翅目昆虫, 尤其对甜菜夜蛾有较高的感染致死力^[3], 被国内外公认为是安全

收稿日期: 2007 - 01 - 18

基金项目: 国家教委留学回国人员科研启动资金(367 号); 河南科技学院高学历人才科研启动项目

作者简介: 赵润洲(1978 -), 男, 辽宁本溪人, 农艺师, 主要从事园艺害虫生物防治研究。

通讯作者: 秦利(1963 -), 男, 吉林松原人, 教授, 主要从事柞蚕生物技术研究。

高效的昆虫病毒。为了使 AcMNPV 成为理想的生物杀虫剂, Merry weather 将人工合成的蝎子毒素基因重组到 AcMNPV 的 P10 启动子下, 建立了基因重组核型多角体病毒, 大大增加了该病毒对鳞翅目昆虫的毒力^[4,5]。研究苜蓿尺蠖核型多角体病毒对甜菜夜蛾的致病力和传播性, 目的在于寻求对甜菜夜蛾综合防治的新途径。

1 材料和方法

1.1 供试昆虫

甜菜夜蛾由中国科学院动物研究所提供。

1.2 供试病毒

野生型病毒 (AcMNPV - C6) 和基因重组病毒 (AcMNPV - AaIT) 由美国加利福尼亚大学提供。

1.3 病毒的制备和浓度的测定

收集感染病毒而死的幼虫, 匀浆后用 3 层纱布过滤, 以 500 r/min 离心 30 s, 弃去残渣碎片, 再以 4000 r/min 离心 20 min, 弃去上清, 无菌 PBS 悬浮后, 交替进行 3 次即可获得多角体粗提物, 再经 30% ~ 60% (w/w) 蔗糖梯度 12000 r/min 离心 30 min, 获得较为纯净的多角体。浓度采用血球计数板计数, 多角体悬浮液保存在 4℃ 下待用。病毒接种和感染病毒幼虫多角体的产生量测定参照 Kunimi^[9] 的方法。

1.4 患病幼虫尸体腐烂速度的测定

参照 Fuxa^[7] 法, 用钝头金属棒接触感染 AcMNPV 的幼虫尸体, 如体壁一触即破则说明该尸体腐烂, 直到只剩下极少数尸体被确定不会腐烂停止调查。

2 结果与分析

2.1 AcMNPV - AaIT 对甜菜夜蛾的毒力

在 (17±1)℃、(23±1)℃, RH 75% 条件下, AcMNPV - AaIT 添食甜菜夜蛾三龄幼虫, 每头幼虫 5μL。从表 1 可看出, AcMNPV - AaIT 对甜菜夜蛾有较高的毒力, 根据死亡率得出 17℃ 下 AcMNPV - AaIT 的浓度对数与死亡率概率值的回归方程为 $y=0.778x+0.39$, LC_{50} 为 $10^{5.92}$ PIB/mL, 由于方程存在误差, 实际上当病毒浓度为 10^6 PIB/mL 时死亡率仅为 30%, 23℃ 的毒力回归方程为 $y=1.485x-1.778$, LT_{50} 为 $10^{4.56}$ PIB/mL, 当浓度达到 10^6 PIB/mL 时, 死亡率达 100%, 而 17℃ 仅为 30%; 从致死时间上看, 23℃ 下平均致死时间和 LT_{50} 均比 17℃ 下短 1~2 d, 说明温度对 AcMNPV - AaIT 的

毒力有较大的影响, 一定的温度范围内病毒的毒力随温度的升高而加强。

表 1 AcMNPV - AaIT 对甜菜夜蛾的毒力

接种浓度 (PIB/L)	感染死亡率 (%)		平均致死时间(d)		LT ₅₀ (d)	
	17℃	23℃	17℃	23℃	17℃	23℃
ck	—	—	—	—	—	—
10 ⁴	10.0	26.7	9.0	7.3	—	—
10 ⁵	26.7	60.0	8.6	6.8	—	—
10 ⁶	30.0	100.0	7.2	5.5	—	4.9
10 ⁷	83.3	100.0	6.7	5.2	6.5	4.7
10 ⁸	96.7	100.0	6.7	5.1	6.1	4.5

2.2 患病幼虫尸体的腐烂速度及病毒的浓度

用浓度为 10^7 PIB/mL 的病毒悬液感染甜菜夜蛾四龄幼虫, 每头添食 5μL, 在幼虫死亡后, 每隔 12h 调查 1 次尸体腐烂数, 结果如图 1。从图 1 中可看出感染野生型病毒 AcMNPV - C6 的幼虫在死亡当天大多数一触即破流出浓汁, 而感染重组型病毒 AcMNPV - AaIT 的幼虫则在死亡后的 3~6d 内才能腐烂, 但通过显微镜下计数可得感染 AcMNPV - C6 和 AcMNPV - AaIT 致死的幼虫尸体中病毒产量无显著差异, 均为 10^8 PIB/头, 按每头幼虫取食病毒约为 5×10^4 PIB, 产量约为取食量的 2000 倍, 所以该病毒在活虫体内有很高的自然繁殖率, 能形成较强的自然流行性。

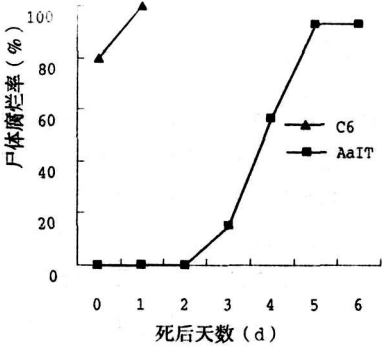


图 1 AcMNPV 感染死亡后甜菜夜蛾尸体的腐烂速度

2.3 AcMNPV 的垂直传播

选取健康的五龄甜菜夜蛾幼虫, 饥饿过夜, 分别用浓度为 10^6 PIB/mL 的 AcMNPV - AaIT 和 AcMNPV - C6 感染, 选取未致死的蛾交配产卵, 卵经 5% 的甲醛消毒 15 min, 观察 F₁ 代幼虫死亡率, 并通过镜检判断病毒致死率, 结果见表 2。AcMNPV - AaIT 和 AcMNPV - C6 对甜菜夜蛾都不存在垂直

表 2 感染 AcMNPV 甜菜夜蛾的传代发病率

病毒种类	总虫数 (头)	死亡率 (%)	更正死亡率 (%)	病毒感染死亡率 (%)
ck	50	12.0	0.0	0.0
AaIT	50	20.0	7.0	0.0
C6	50	14.0	—	—

传播, F₁ 代均未发现多角体病毒。

2.4 低温贮藏对 AcMNPV - AaIT 毒力的影响

采用在 4℃下冷藏 3 年的 AcMNPV - AaIT 病毒悬液, 在 23℃下处理甜菜夜蛾二龄幼虫, 并与新繁殖病毒进行比较, 结果如表 3。

表 3 贮藏 3 年的 AcMNPV - AaIT 病毒对甜菜夜蛾的毒力作用

接种浓度 (PIB/L)	感染死亡率(%)		平均致死时间(d)		LT ₅₀ (d)	
	RT	RT'	RT	RT'	RT	RT'
ck	6.7	6.7	—	—	—	—
10 ⁶	80.8	83.3	6.2	5.3	6.1	5.6
10 ⁷	100.0	100.0	5.3	5.3	3.2	5.8
10 ⁸	100.0	100.0	4.7	4.8	4.2	4.3

注: RT 为新繁殖的病毒, RT' 为经过 3 年贮藏的病毒

从表 3 可看出, AcMNPV - AaIT 病毒悬液经过 3 年的冷藏, 与新繁殖的病毒相比感染死亡率及致死时间没有明显差异。因此 AcMNPV - AaIT 制成生防制剂后, 可以经过较长时间的冷藏, 使用方便。

3 小结与讨论

1) AcMNPV - AaIT 是一种对甜菜夜蛾毒力较强病毒, 在 23℃下当添食浓度为 10⁵ PIB/mL 即每头幼虫取适量约为 500PIB / L 时, 死亡率达 60%, 当浓度为 10⁶ PIB/mL 以上时死亡率达 100%。

2) 温度对 AcMNPV - AaIT 的毒力有极大的影响, 23℃下的毒力显著比 17℃的毒力高。17℃下当浓度为 10⁶ PIB / mL 时死亡率仅为 30%, 而且致死时间也明显比 23℃长。

3) 害虫感染多角体病毒后的症状一般为活动迟缓, 食量减少, 体内组织液化, 死后尸体易烂, 流出含有大量病毒的脓汁, 俗称“脓病”, 这就造成了多角体病毒很强的自然流行性, 重组型病毒的腐烂速度

虽然略比野生型的慢, 但病毒在虫体内也有较高的繁殖率, 说明重组型病毒 AcMNPV - AaIT 在自然界也存在了较高的流行性。

4) 在低温下病毒贮藏 3 年对毒力没有影响, 说明该病毒在离开宿主的环境中能保持杀虫活力, 主要是因为病毒包埋在多角体内, 所以, 可在宿主体外长时间存活, AcMNPV - AaIT 病毒的这一优点不仅能加强在自然界的流行性, 而且有利于该病毒制成生防制剂商品化生产。

5) 通过镜检 F₁ 代的方法确定了 AcMNPV 不存在经卵巢传递的垂直传播, 说明该病毒在环境中的流行主要靠患病幼虫间的水平传播, 和其死虫流出的脓汁在环境中的传播。

综上所述, AcMNPV - AaIT 是一种对甜菜夜蛾毒力较高, 在自然界中易于流行的病毒, 是一种较为理想的生防病毒。

参考文献:

[1] 郭建平, 张建军, 史要强, 等. 甜菜夜蛾在豫西地区的生活史和不同温度发育历期研究[J]. 河南农业科学, 2005(8): 63 - 64.

[2] 王春义. 甜菜夜蛾的发生及防治[J]. 河南农业科学, 2001(1): 21 - 22.

[3] 胡蓉, 马永平, 徐进平, 等. AcNPV . Bt . En 复配剂对甜菜夜蛾幼虫的毒力测定[J]. 中国生物防治, 2002, 18 (1): 47 - 49.

[4] 秦利, 张涛, 刘彦群, 等. 增效物质对核型多角体病毒 AcMNPV 的感染增效作用[J]. 中国生物防治, 2002, 18(1): 43 - 44.

[5] 王玲玲, 樊虹, 徐艳聆, 等. 昆虫病毒在害虫生物防治中的应用[J]. 沈阳农业大学学报, 2004, 35(1): 76 - 79.

[6] Fuxa J A, Fuxa R, Richter A R. Host insect survival time and disintergration in relation to population density time and dispersion of recombinant and wild type nucleopolyhedroviruses[J]. Biological Control, 1998, 12: 143 - 150.

[7] Kunimi Y, Fuxa J R, Hammock B D. Comparison of wild type and genetically modified nuclear polyhedrosis viruses of *Auographa californica* for mortality, virus replication and polyhedra production in *Trichoplusia ni* larvae[J]. Entomol Exp Appl, 1996, 81: 251 - 257.