

# 杨尺蠖核多角体病毒的研究\*

## VI. 病毒的贮藏效果

王贵成 于在林 佟守元

(中国林业科学研究院林业研究所) (内蒙古锡林郭勒盟镶黄旗林场)

**摘要** 杨尺蠖核多角体病毒,在不同条件和不同时间的贮藏效果试验证明,在4℃冰箱或-20℃低温冰箱内贮藏,多角体制备物及其配制的AciNPV杀虫剂,其活性至少可保持两年;在室温条件下贮藏,多角体制备物的活性仅能保持一年,而加工制剂则可保持近两年。

**关键词** 杨尺蠖;核多角体病毒,病毒贮藏效果

近几年来,应用AciNPV杀虫剂防治杨尺蠖,已取得了令人满意的结果。并证明其后续作用明显,不污染环境,不直接杀伤天敌,受到生产部门的广泛重视<sup>[1-6]</sup>。但病毒在贮藏期间,随着保存条件的不同和时间的延长,毒力会逐渐衰减,甚至完全丧失活力<sup>[7-18]</sup>。因此,研究寻找适宜的贮藏方法,并阐明AciNPV在不同贮藏条件下的毒力衰减规律,无疑对病毒制剂的生产、保存及推广应用,具有十分重要的意义。现将1983—1985年连续三年贮藏试验的生物测定结果报道如下。

## 一、材料与方方法

### (一) 供试材料

1. 供试病原及其制备保藏 供试病毒均为AciNPV坝上毒株<sup>[1]</sup>,经室内外增殖复制后<sup>[4]</sup>,置-20℃冰箱保存。10个月后取出融解,按Dulmage等(1970)所叙述的丙酮-乳糖共沉法略加改进,从病死虫中回收AciNPV干粉,其含量为 $5.0 \times 10^{10}$  PIB/g,作为标准样品<sup>[6]</sup>。与1983年4月配制的待测制剂<sup>[6]</sup>,各一式三份,分别贮藏于-20℃低温冰箱、4℃冰箱和室温避光保存备用。连续三年,每年生测一次。

2. 供试幼虫及其来源 试虫均为杨尺蠖3龄初幼虫。1983年来自内蒙古锡盟镶黄旗林场的榆树林;1984年来自河南省宁陵县国营林场杨树林;1985年来自天津市宝坻县榆树防护林。要求供试验幼虫的龄期大小及生理状态基本一致。

### (二) 试验方法

1. 生物测定方法 每年称取不同贮藏条件下保存的标准样品与待测制剂各0.5g,按

本文于1988年2月23日收到。

• 参加本项研究的还有吴燕同志。

所需浓度10倍稀释成 $2.5 \times 10^7$ 、 $2.5 \times 10^6$ 、 $2.5 \times 10^5$ 、 $2.5 \times 10^4$ 、 $2.5 \times 10^3$ 、 $2.5 \times 10^2$ 六个浓度,每次至少以五个浓度进行生测,以浸叶法感染杨尺蠖3龄初幼虫,每种浓度60头,各重复三次,并设有同样数量的未处理对照。浸叶接毒后,任其取食48h更换新鲜叶片。整个试验均在室温条件下进行,接毒感染9—10d结束。按常规数理统计方法,计算其幼虫死亡率及校正死亡率。再将死亡率换算成机率值,浓度换算成对数值,求其浓度与死亡率直线回归方程,分别计算 $LC_{50}$ 及其95%置信限。

2. 形态的电镜观察 称取不同贮藏条件下的标准样品0.5g,加无菌水稀释,按常规方法进行差异离心提纯<sup>[1]</sup>。提纯后的多角体,涂片喷镀经PHILIPS SEM-505型扫描电镜观察其形态变化,并固定包埋经LKB-UITRATHIN型超薄切片机切片,PHILIPS EM-400T型透射电镜观察其内部结构变化。

## 二、结果分析

### (一) 标准样品与待测制剂的毒力比较

将-20℃低温冰箱贮藏一个月的AciNPV标准样品与AciNPV BWV-831待测制剂取出,于1983年5月25日以不同浓度饲喂感染3龄初杨尺蠖幼虫,以比较其活性,其结果列入表1。根据表1计算所得直线回归方程及函数图象见图1所示。可见观察值与计算值比较接近,两者的 $LC_{50}$ 均相等。标准制剂的致死中浓度( $LC_{50}$ )为 $2.84 \times 10^3$  PIB/ml,95%置信限在 $1.70 \times 10^3$ — $4.76 \times 10^3$ 之间(表2)。待测制剂致死中浓度( $LC_{50}$ )为 $2.84 \times 10^3$  PIB/ml,95%置信限为 $1.43 \times 10^3$ — $5.56 \times 10^3$ (表2)。两者相比较仅坡度(b值)略有差异(图1),说明标准样品对杨尺蠖3龄初幼虫的敏感差异性小,而待测制剂的敏感差异略大,这可能与分散性有关。

表1 两种制剂感染杨尺蠖3龄初幼虫的死亡率及机率值 (内蒙古,1983.5)

NPV 标准样品				待测制剂 (BWV-831)			
感染浓度 (PIB/ml)	供试幼虫数	感染死亡率 (%)	机率值 (Y)	感染浓度 (PIB/ml)	供试幼虫数	感染死亡率 (%)	机率值 (Y)
$2.5 \times 10^6$	61	100.0	—	$2.5 \times 10^6$	54	98.2	7.05
$2.5 \times 10^5$	64	96.8	6.88	$2.5 \times 10^5$	47	81.3	5.88
$2.5 \times 10^4$	57	66.4	5.41	$2.5 \times 10^4$	60	62.6	5.33
$2.5 \times 10^3$	51	49.3	4.97	$2.5 \times 10^3$	51	42.8	4.82
$2.5 \times 10^2$	69	22.0	4.23	$2.5 \times 10^2$	52	36.7	4.67

表2 两种制剂感染杨尺蠖3龄初幼虫死亡30—90%所需浓度及其95%置信限

标准制剂				待测制剂 (BWV-831)			
死亡率 (%)	感染所需浓度 (PIB/ml)	95% 置信限		死亡率 (%)	感染所需浓度 (PIB/ml)	95% 置信限	
		下 限	上 限			下 限	上 限
30	$6.81 \times 10^2$	$3.83 \times 10^2$	$1.20 \times 10^3$	30	$3.65 \times 10^2$	$1.25 \times 10^2$	$1.05 \times 10^3$
50	$2.84 \times 10^3$	$1.70 \times 10^3$	$4.76 \times 10^3$	50	$2.84 \times 10^3$	$1.43 \times 10^3$	$5.66 \times 10^3$
70	$1.19 \times 10^4$	$7.28 \times 10^3$	$1.93 \times 10^4$	70	$2.22 \times 10^4$	$1.09 \times 10^4$	$4.54 \times 10^4$
90	$9.57 \times 10^4$	$4.57 \times 10^4$	$2.00 \times 10^5$	90	$4.50 \times 10^5$	$1.67 \times 10^5$	$1.21 \times 10^6$

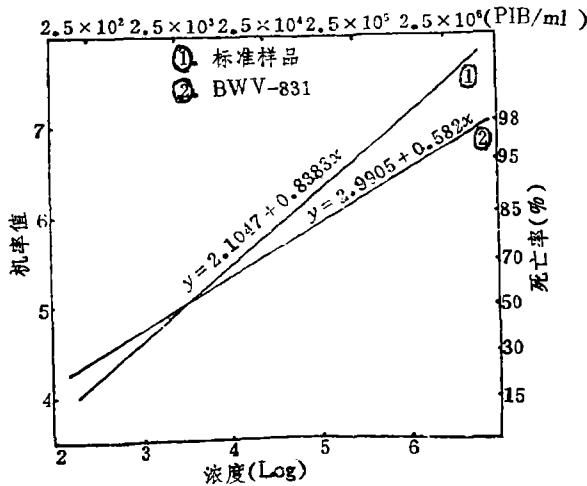


图1 感染杨尺蠖3龄幼虫毒力比较

(二) 贮藏条件对 AciNPV 标准样品毒力衰减的影响

生物测定结果见表 3、4，其直线回归方程及函数图象见图 2、3。说明在不同贮藏条件下保存一年后，除室温下贮藏的标准样品毒力稍有减低外，-20℃和4℃下贮藏的样品差异性不大。而两年后差异较明显。特别是室温下保存的标准样品更为明显，若与-20℃下的样品比较，其毒力约降低90个 log LC<sub>50</sub> 值，而4℃下仅减低2个 log LC<sub>50</sub> 值。为了比较，以-20℃贮藏的标准样品的 LC<sub>50</sub> 为标准，按下列公式计算4℃和室温下贮藏的标准样品的残留原始活性，以便准确地计算其毒力衰减百分比。

$$\text{残留原始活性}(\%) = \frac{-20\text{℃标准样品的 } LC_{50}}{\text{待测标准样品的 } LC_{50}} \times 100\%$$

表3 不同贮藏条件 AciNPV 标准样品毒力衰减比较 (1984—1985年)

感染浓度 (PIB/ml)	12 个 月			24 个 月		
	-20℃	4℃	室 温	-20℃	4℃	室 温
2.5 × 10 <sup>7</sup>	100.0	100.0	98.4	—	—	—
2.5 × 10 <sup>6</sup>	98.5	98.7	89.4	93.9	82.7	51.7
2.5 × 10 <sup>5</sup>	90.3	61.8	50.8	67.2	61.2	29.5
2.5 × 10 <sup>4</sup>	41.9	36.0	21.0	36.6	37.2	15.0
2.5 × 10 <sup>3</sup>	9.3	20.0	16.4	18.8	17.6	11.0
2.5 × 10 <sup>2</sup>	—	—	—	13.6	12.7	4.3

注：1984年在河南宁陵县林场，1985年在天津市宝坻县苗圃。

表4 不同贮藏条件下标准样品的 LC<sub>50</sub> 及 95% 置信限

贮藏条件	贮藏时间 (月)	LC <sub>50</sub> (PIB/ml)	95% 置 信 限	
			下 限	上 限
-20℃	12	3.38 × 10 <sup>4</sup>	2.20 × 10 <sup>4</sup>	5.18 × 10 <sup>4</sup>
4℃	12	4.12 × 10 <sup>4</sup>	2.96 × 10 <sup>4</sup>	8.19 × 10 <sup>4</sup>
室 温	12	1.04 × 10 <sup>5</sup>	6.39 × 10 <sup>4</sup>	1.68 × 10 <sup>5</sup>
-20℃	24	3.10 × 10 <sup>4</sup>	1.77 × 10 <sup>4</sup>	5.40 × 10 <sup>4</sup>
4℃	24	6.75 × 10 <sup>4</sup>	3.53 × 10 <sup>4</sup>	1.29 × 10 <sup>5</sup>
室 温	24	3.06 × 10 <sup>6</sup>	1.19 × 10 <sup>6</sup>	7.78 × 10 <sup>6</sup>

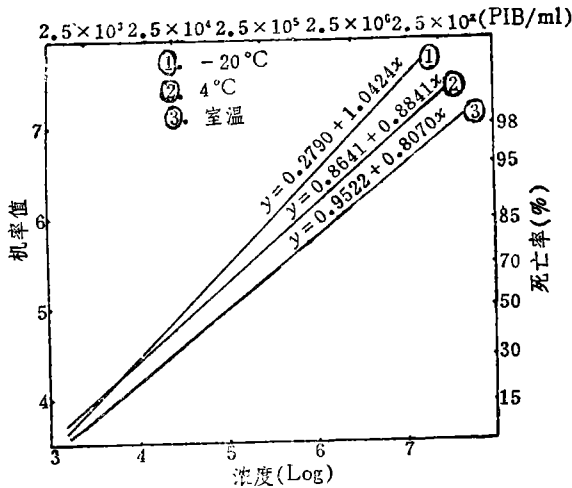


图2 贮藏一年后的标准样品毒力衰减比较

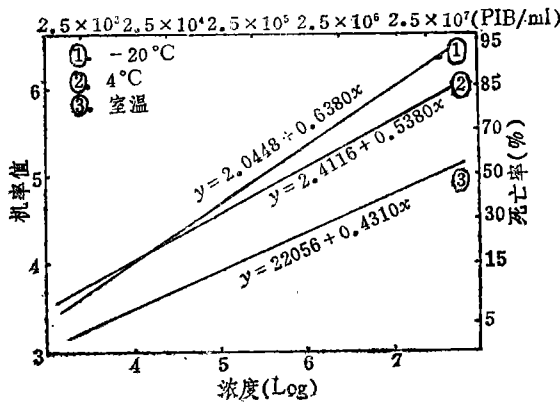


图3 贮藏2年的标准样品毒力衰减比较

品相比,其杀虫效力无甚差异,仅 $LT_{50}$ 略有延长,但在室温下贮藏的BWV-831病毒杀虫剂与标准样品,随着时间的延长,其杀虫活力则有较明显的差异。特别是室温下贮藏的标准样品,其杀虫效力损失较大,两年后仅残留51.7%,而BWV-831病毒杀虫剂的效力,还有82.2%,两者相差30.5%。若与-20℃下贮藏的样品相比,一年后BWV-831制剂减低活力4%,标准样品仅减低1.5%;但贮藏两年后,前者仅减低活力8.5%,后者则减低42.2%,分析其原因,可能与标准样品未加光保护剂与填充有关。由此可见,添加辅助剂的BWV-831病毒杀虫剂就是在室温条件下贮存,亦可达两年之久。虽然活力有所减低,但其效果仍在80%以上。在-20℃条件下贮藏两年后,BWV-831制剂感染力仍高达91.7%,与-20℃下贮藏的标准样品无明显差异。

#### (四) 不同贮藏条件下AciNPV的形态变化

为探求在4℃和室温下贮存的样品的毒力有不同程度降低的原因,进行了扫描电镜形态观察。结果表明(图版I),无论贮存一年或两年的病毒,其表面形态无多大差异,而多角体的超薄切片观察,证明病毒粒子已有少量丧失,但差异性不明显(略),这还有待进一步研究。

通过两年试验表明(表5),在4℃下贮藏的标准样品,一年后残留原始活性还有96.5%,第二年为93.0%,平均每年损失活性3.5%。而室温条件贮存的标准样品,一年后残留原始活性为90.4%,两年后仅为69.3%,平均每年丧失活力15.4%。比Dulmage等(1977)试验结果略高<sup>[12]</sup>,但不及Lewis(1978)对舞毒蛾NPV的贮藏试验效果<sup>[13]</sup>。在-20℃贮藏的标准样品,其毒力显然比较稳定。但与较新的制备样品比较,一年后也会丧失一些活力,仅是不明显;两年后,其毒力减低5.5倍(表6),这一结果与Dulmage等(1977)对实夜蛾的试验相一致<sup>[12]</sup>。同时亦证明,丙酮-乳糖共沉样品在贮藏过程中,随着时间的延长,丙酮对病毒活性有一定影响,但这是微不足道的。这一结论,与Ignoff等(1978)、Shapiro(1982)所得结论基本一致<sup>[14,16]</sup>。

#### (三) AciNPV杀虫剂的贮藏效力比较

以标准样品为对照,按生物活性测定的同一方法<sup>[2]</sup>重复三次,试验观察10d,试验结果看出(表7),在-20℃下贮藏1—2a后,两种病毒杀虫剂与标准样

表5 不同贮藏条件对 AciNPV 标准样品毒力的影响

贮藏条件	0 月		12 月		24 月	
	LC <sub>50</sub>	OAR	LC <sub>50</sub>	OAR	LC <sub>50</sub>	OAR
-20℃	3.45	100.0	4.53	100.0	4.49	100.0
4℃	3.45	100.0	4.69	96.5	4.83	93.0
室温	3.45	100.0	5.01	90.4	6.48	69.3

表6 标准样品与待测样品毒力比较

贮藏时间 (月)		LC <sub>50</sub> (PIB/ml)	95% 置信限	
冰冻死虫 (-20℃)	沉淀干粉 (-20℃)		下限	上限
10	12	3.38×10 <sup>4</sup>	2.20×10 <sup>4</sup>	5.18×10 <sup>4</sup>
5	5	1.76×10 <sup>4</sup>	1.04×10 <sup>4</sup>	2.98×10 <sup>4</sup>
10	24	3.10×10 <sup>4</sup>	1.77×10 <sup>4</sup>	5.40×10 <sup>4</sup>
10	1	4.73×10 <sup>3</sup>	2.51×10 <sup>3</sup>	8.90×10 <sup>3</sup>

表7 不同贮藏方法、时间对三种 AciNPV 制剂效力的影响

制剂名称	贮藏方法	使用浓度 (PIB/ml)	保存时间 (月)					
			0		12		24	
			死亡率(%)	LT50	死亡率(%)	LT50	死亡率(%)	LT50
BWV-831	-20℃	2.5×10 <sup>6</sup>	98.1	7.74	100.0	7.52	91.7	8.18
BWV-831	室温	2.5×10 <sup>6</sup>	98.1	7.74	96.0	8.36	82.2	8.68
BWV-832	-20℃	2.5×10 <sup>6</sup>	—	—	100.0	7.46	—	—
标准样品	-20℃	2.5×10 <sup>6</sup>	100.0	7.74	100.0	7.33	93.9	7.79
标准样品	室温	2.5×10 <sup>6</sup>	100.0	7.74	98.5	8.22	51.7	9.65

### 三、结 语

通过贮藏试验表明, 无论是标准样品或是BWV-831和BWV-832型制剂, 在-20℃下贮存两年其毒力基本上是稳定的。在4℃下贮存亦可。但在室温下贮存两年标准样品则比BWV-831降低活力30.5%。看来AciNPV杀虫剂比标准样品耐贮存。虽然如此, 但作为制剂产品, 我们建议最好还是以丙酮-乳糖制备物形式贮存比较好。因其体积较小, 贮存方便, 可随取随配, 这样可节省贮存费用。如无贮藏设备, 亦可立即配制成制剂, 贮存在干燥避光的室温条件下, 但时间不应超过两年。

### 参 考 文 献

- [1] 王志贤等, 1982, 杨尺蠖核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, 24(2): 170—176。
- [5] 王贵成等, 1988, 杨尺蠖核多角体病毒的研究 IV. 病毒的回收试验, 林业科学研究, 1(2): 162—168。
- [6] 王贵成等, 1988, 杨尺蠖核多角体病毒的研究 V. AciNPV 杀虫剂的研制及产品检测, 林业科学研究, 1(5):

508—515。

- [7] 吕鸿声, 1982, 昆虫病毒与昆虫病毒病, 科学出版社, 369—371。
- [8] 梁东瑞, 1983, 物理化学因子对菜粉蝶颗粒体病毒感染力的影响, 昆虫知识, 20(2), 73—76。
- [9] 张友清等, 1982, 棉铃虫(*Heliothis armigera*)病毒杀虫剂研制及其药效鉴定, 病毒学集刊, (1), 93。
- [10] 龚得政等, 1983, 不同方法保存的斜纹夜蛾核多角体病毒(*Spodoptera liture* NPV)活性的比较, 昆虫病毒研究, (2), 34—38。
- [11] Cunningham, J. C., 1970, The effect of storage on the nuclear polyhedrosis virus of the eastern, hemlock looper, *Lambdina fiscellaria*, J. Invertebr. Pathol., 16, 352—356。
- [12] Dulmage, H. et al, 1977, Industrial and international standardization of microbial pesticides I, insect viruses, Entomophaga, 22(2), 131—139。
- [13] Lewis, F. B. et al, 1978, Effect of storage on the virulence of gypsy moth nucleopolyhedrosis inclusion bodies, J. Econ. Entomol., 71(5), 719—722。
- [14] Ignoffo, C. M. et al, 1978, Characteristics of Baculovirus preparations processed from living and dead larvae, J. Econ Entomol., 71(2), 186—188。
- [15] Kurstak, E. (Ed), 1982, Microbial and viral pesticides. Marcel Dekker, Inc. New York and Basel, 448—452。

## STUDIES ON THE NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS OF THE POPLAR LOOPER *APOCHEIMA CINERARIUS* VI. STORAGE EFFECT TEST ON THE VIRULENCE OF ACINPV

Wang Guicheng Yu Zailin

(The Research Institute of Forestry CAF)

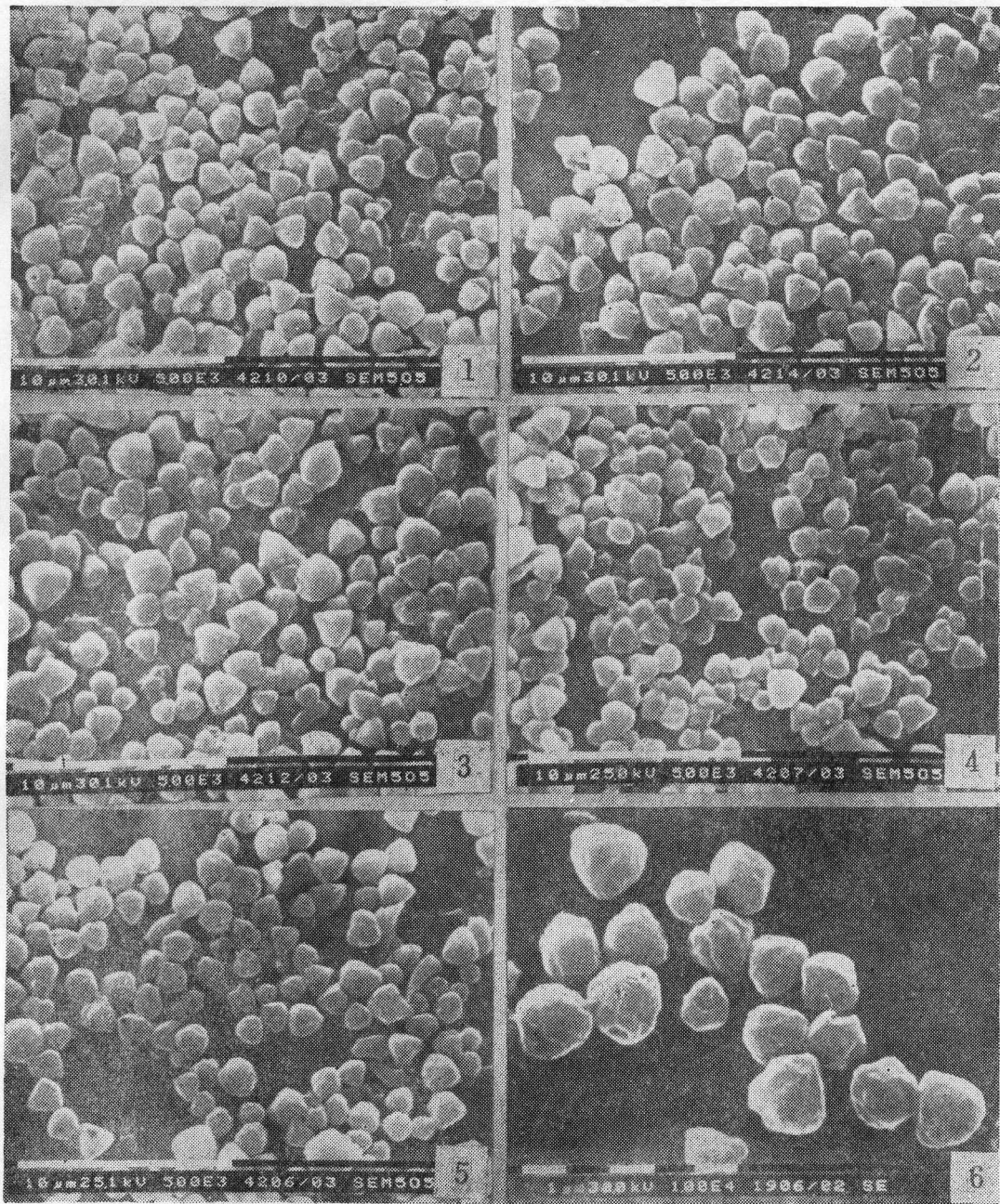
Tong Shouyuan

(State Forest Farm, Xianhuang B., Nei Mongol Aut. Reg.)

**Abstract** Polyhedral inclusion bodies of nuclear polyhedrosis virus (NPV) of poplar looper *Apocheima cinerarius*, were stored as dried powder and formulations under various conditions and for various lengths of time. The dry polyhedral powder made by the viral precipitation with acetone from lactose suspensions and its preparing formulations were stored at room temperatures, or in refrigerator (4 °C) or in freezing (-20 °C).

The results indicated that the viral activity of the dry polyhedral powder (AciNPV) and the formulations could be retained for two years in refrigerator (4 °C) or in freezing (-20 °C). Dry powder stored at room temperature could only retain its viral activity for one year. The formulation of AciNPV stored at room temperature showed a better result that it was fairly stable for nearly two years.

**Key words** *Apocheima cinerarius*; NPV; storage effect of virus



1.  $-20^{\circ}\text{C}$  低温冰箱贮藏 2 年之 AciNPV 多角体形态(共沉干粉)  $5000\times$
2.  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱贮藏 2 年之 AciNPV 多角体形态(共沉干粉)  $5000\times$
3. 室温条件下贮藏 2 年之 AciNPV 多角体形态(共沉干粉)  $5000\times$
4.  $-8^{\circ}\text{C}$  贮藏 6 年之 AciNPV 多角体形态(病死虫)  $5000\times$
5.  $-8^{\circ}\text{C}$  贮藏 7 年之 AciNPV 多角体形态(病死虫)  $5000\times$
6. AciNPV 多角体形态(病死虫)  $10000\times$