

文章编号: 1001-1498(2006)02-0216-05

H aNPV 病毒对寄主昆虫的持续作用研究

曲良建¹, 张永安^{1*}, 王玉珠¹, 郎杏茹²

(1. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 国家林业局森林保护学重点实验室, 北京 100091

2. 宁夏森林病虫害防治检疫总站, 宁夏 银川 750001)

摘要: 用不同浓度的 H aNPV 病毒感染 3 龄棉铃虫幼虫并分别收集不同处理的存活试虫进行室内传代饲养。结果表明, 病毒对寄主昆虫不仅具有直接致死作用, 而且对蛹质量和化蛹均有明显的影响, 尤其是对亲代和子一代的寄主昆虫。同时, 通过 PCR 技术, 从子一代的幼虫和蛹中成功检测到该病毒, 从而在分子水平上证明了病毒能够经过亲代传递到子代的种群中。这对病毒的高效利用和害虫的持续控制具有重要的理论和实践意义。

关键词: 持续控制; 棉铃虫核型多角体病毒; PCR

中图分类号: S763 文献标识码: A

Studies on Sustainable Effects for *Helicoverpa armigera* Nuclear Polyhedrosis Virus to Host Insects

QU Liang-jian¹, ZHANG Yong-an¹, WANG Yu-zhu¹, LANG Xing-ru²

(1. Research Institute of Forest Ecology Environment and Protection, CAF, Key Laboratory of Forestry Protection, State

Forestry Administration, Beijing 100091, China 2. Center Station of Control and Quarantine of Forest

Diseases and Pests, Yinchuan 750001, Ningxia, China)

Abstract Third instars larvae of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, were infected with different concentrations of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus (H aNPV). Survivors were collected respectively and reared in laboratory room. Mortality rate of the larvae, average weight of the single pupa and pupation rate were observed in parental generation and successive filial generations. The results showed that the virus not only led to death of larvae in parental and filial generation, but also impacted the average weight of the single pupa and pupation rate, especially to the parental and the first filial generation. The experimental data indicated that the virus could weaken the host in filial generations, which could control populations of the host for a long time. Meanwhile, polymerase chain reaction (PCR) amplification of polyhedrin gene sequences demonstrated that the virus was present in eggs and pupae whose parents were infected. This method might provide a better understanding of nucleopolyhedrovirus which could transmit from parental generation to filial generation. The research would play an important role in utilizing the virus effectively to control the pest persistently.

Key words sustainable control; H aNPV; polymerase chain reaction (PCR)

利用昆虫病毒防治农、林和其他经济作物害虫, 是害虫可持续控制的重要方法之一。近些年来, 随着人们生活水平的提高和环保意识的增强, 使用和开发高效、低毒、无公害的农药已成为发展的必然趋

势, 而昆虫病毒不仅具有寄主专一性、防治效果好、不污染环境、对其他生物安全、不使害虫产生抗药性等优点, 而且病毒还能在环境中积累, 可通过外界因子的刺激或诱发等多种途径在害虫种群中形成流行

收稿日期: 2005-11-09

基金项目: 国家“十五”攻关项目“林木病虫害环境协调性农药及其航空喷洒技术研究”(2004BA509B12)

作者简介: 曲良建(1977-), 男, 河南南阳人, 硕士, 主要从事昆虫病毒的基础及开发应用研究。

通讯作者: 张永安, 研究员, 主要从事昆虫病原微生物及害虫的可持续控制研究。

病而长期控制虫口密度,在害虫的可持续控制中发挥着越来越重要的作用^[1,2]。

核型多角体病毒 (nuclear polyhedrosis virus NPV)对鳞翅目 (Lepidoptera) 幼虫具有很高的致病力,是昆虫病毒种类中最具潜力者,也是研究应用最广泛的一类^[1]。但在病毒的应用和研究中,人们更关注的是病毒对当代寄主昆虫的直接致死作用,而对寄主多方面的影响和持久的作用报道很少,尤其对带毒昆虫持续传代研究则更少。为了探讨病毒对寄主的持续作用,本实验测定了寄主接种不同浓度的病毒后对其亲代和子代的蛹质量、化蛹率及幼虫死亡率等生物学特性参数的持续影响,并用分子生物学的方法对病毒进行检测,以期为今后病毒制剂的应用和评价,以及病毒施用后对寄主昆虫种群动态的影响提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 供试病毒与寄主

棉铃虫核型多角体病毒 (*Helicoverpa armigera* nuclear polyhedrosis virus, H aNPV)由中国林科院森林生态环境与保护研究所生物防治研究室提供,棉铃虫 (*Helicoverpa armigera* Hübner)由中国科学院动物所提供,在室内饲养多代后做为供试虫源。试虫的人工饲料由北京中林恩多威生物工程技术有限公司提供。

1.2 H aNPV 病毒的增殖和多角体的纯化

取冰箱中保存的 H aNPV 病毒在显微镜下重新计数后,取适量病毒用蒸馏水稀释到 1.0×10^7 PIB \cdot mL⁻¹ 浓度感染棉铃虫 3 龄幼虫,收集具有典型病毒症状的病死虫尸置冰箱中冷冻保存,然后研磨匀浆冷冻虫尸,加水稀释后 3 层纱布过滤,经差速和蔗糖梯度离心后双蒸水悬浮沉淀,即为纯化的病毒多角体。用血球计数板方法计数后贴上标签置 4℃ 冰箱中保存备用。

1.3 H aNPV 病毒的生物活性测定

取适量纯化后的 H aNPV 病毒分别稀释成 1.0×10^7 、 1.0×10^6 、 1.0×10^5 、 1.0×10^4 、 1.0×10^3 PIB \cdot mL⁻¹ 5 个不同的浓度,另设一组蒸馏水对照,每个处理 60 头,重复 3 次。具体方法参照参考文献 [3]。

1.4 亲代带毒虫源的获取及传代幼虫、蛹和成虫的管理

1.4.1 亲代带毒虫源的获取 用 6.25×10^3 (LC₉₀)、 3.44×10^4 (LC₇₀)、 1.89×10^5 (LC₅₀)、 2.22

$\times 10^6$ PIB \cdot mL⁻¹ (LC₃₀) 4 种不同浓度的 H aNPV 病毒感染健康的 3 龄棉铃虫幼虫,具体方法同 1.3 分别收集不同处理后的存活幼虫即为亲代带毒虫源。

1.4.2 亲代及传代蛹的管理 待不同处理的亲代幼虫化蛹 2 d 后分别称蛹质量,然后放入灭菌的湿润沙土中置 25 ± 0.5 ℃ 培养箱中(无光照处理)待其羽化。各传代蛹的管理方法与此相同。

1.4.3 传代成虫的管理 将不同处理羽化后的成虫分别小心移入养虫笼中饲养,笼的顶部覆盖灭菌纱布供其产卵,四周悬挂蘸有营养液的棉球以便成虫补充营养,饲养室温度控制在 $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$,光照 16 h,具体饲养技术见参考文献 [4]、[5]。

1.4.4 传代幼虫的饲养及管理 将不同处理成虫产的卵置于透明保鲜袋中,待幼虫孵出后用灭菌的毛笔轻轻接入放有人工饲料的养虫瓶中,每瓶 1 头,放入人工饲料 10 g 左右于培养箱中饲养至化蛹,饲养温度为 27 ± 0.5 ℃,光照 16 h,饲养过程中记录和统计不同处理的幼虫死亡率和化蛹率。

1.5 饲养器具及接虫工具的处理

饲养试虫的器具都进行严格消毒。具体方法为:养虫瓶、养虫笼和做人工饲料的器皿等塑料制品用清水洗净后放入 5% 的次氯酸钠溶液中消毒 30 min,然后再用清水冲净后晾干备用;接虫用的小毛笔、镊子、切刀等工具或器皿先用 5% 的甲醛消毒,然后用清水冲洗,最后进行高温湿热灭菌。

1.6 子代幼虫和蛹的 PCR 检测

分别以子一代 (F₁) 的幼虫和蛹提取的总 DNA 为模板,根据 H aNPV 病毒的多角体蛋白基因设计特异性引物进行 PCR 扩增,并以健康虫的总 DNA 为模板为对照,对子一代蛹和幼虫体内的 H aNPV 病毒进行分子检测,具体方法和步骤见参考文献 [3]。

2 结果与分析

2.1 H aNPV 的 LC₅₀ 测定结果

用不同浓度的 H aNPV 感染棉铃虫 3 龄末幼虫,将各浓度的幼虫最终死亡率转换成机率值后求出浓度对数值与死亡机率值的回归方程(表 1)。从表中可以看出,幼虫的感染浓度与死亡率之间存在明显的正相关关系,即幼虫死亡率随着感染浓度的增大而增加,该病毒株系的致死中浓度为 3.44×10^4 PIB \cdot mL⁻¹。

表 1 HaNPV对棉铃虫 3龄幼虫的生测结果分析

处理	回归方程	相关系数	LC ₅₀ /(PIB·mL ⁻¹)	95%置信限
感染浓度	$Y = 1.788 + 0.708x$	0.9905	34.400	20.735 ~ 57.108

表中 Y 为死亡率值; x 为浓度对数值

2.2 HaNPV的 LT₅₀测定结果

棉铃虫幼虫感染病毒后,幼虫感染天数与死亡率的关系见图 1,不同浓度的半致死时间见表 2。从图 1 中可以看出,幼虫被感染的浓度越高,开始死亡的时间越早,死亡高峰主要集中在感染后第 5~6 d,且随着感染浓度的降低,死亡高峰有向后推迟的趋势;不同处理的半致死时间也随着感染浓度的降低而延长,当感染浓度为 1.0×10^7 PIB·mL⁻¹ 时,其半致死时间为 4.77 d, 1.0×10^5 PIB·mL⁻¹ 时,半致死时间延长为 6.63 d。

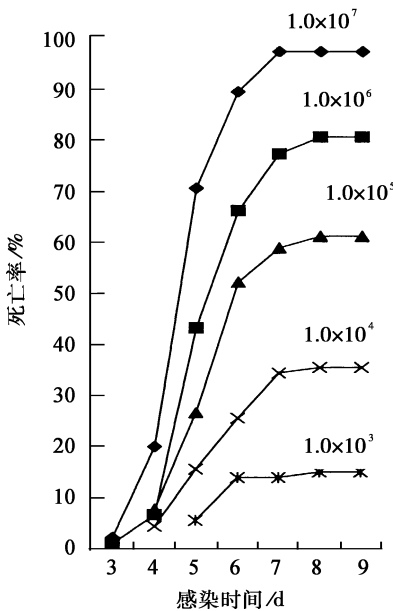


图 1 不同浓度对棉铃虫幼虫的感染时间与死亡率关系图

表 2 不同浓度 HaNPV 感染棉铃虫 3 龄末幼虫的 LT₅₀

处理浓度 / (PIB·mL ⁻¹)	回归方程	LT ₅₀ / d	95%置信限
1.0×10^7	$Y = 0.2594x - 0.7383$	4.77	2.09 ~ 7.15
1.0×10^6	$Y = 0.1805x - 0.5343$	5.73	3.65 ~ 7.61
1.0×10^5	$Y = 0.1386x - 0.4187$	6.63	4.81 ~ 8.45

表中 Y 为死亡率值; x 为浓度对数值

2.3 HaNPV对寄主持续作用的研究结果

根据 2.1 中的回归方程,可求出使 3 龄末棉铃虫幼虫死亡 90%、70%、50% 和 30% 的理论浓

度依次为 2.22×10^6 (LC₉₀)、 1.89×10^5 (LC₇₀)、 3.44×10^4 (LC₅₀)、 6.25×10^3 PIB·mL⁻¹ (LC₃₀)。用上述浓度分别感染 3 龄末棉铃虫幼虫,统计幼虫死亡率、化蛹率和蛹质量,并分别收集不同浓度感染未致死幼虫的蛹进行传代饲养,实验结果见表 3 和表 4。

表 3 看出,幼虫死亡率和预期理论结果基本吻合。亲代被感染后,幼虫死亡率和化蛹率随着感染浓度的增加而降低,蛹的平均质量以处理 3.44×10^4 PIB·mL⁻¹ (LC₅₀) 最小,为 199.6 mg,远远低于对照的 266.0 mg。各处理在幼虫死亡率、化蛹率和蛹质量等方面均与对照存在极显著差异,这表明病毒对亲代寄主的作用明显。

表 3 亲代 (F₀) 被感染后的试验结果

处理 / (PIB·mL ⁻¹)	试虫数 / 头	死亡数 / 头	死亡率 %	平均单头蛹质量 / mg	化蛹率 %
LC ₉₀	540	495	91.67*	235.6*	45.14*
LC ₇₀	360	263	73.06*	241.3*	61.37*
LC ₅₀	180	89	49.44*	199.6*	87.36*
LC ₃₀	180	59	32.77*	260.0*	87.05*
CK	120	7	5.83	303.6	96.63

注: * 与对照差异极显著, $P < 0.01$; * 与对照差异显著, $P < 0.05$, 下同。

表 4 子代垂直传递的试验结果

传递代数	处理 / (PIB·mL ⁻¹)	试虫数 / 头	幼虫死亡率 %	平均单头蛹质量 / mg	化蛹率 %
子一代 (F ₁)	LC ₇₀	240	50.42*	255.4*	72.28*
	LC ₅₀	240	47.95*	242.9*	77.31*
	LC ₃₀	180	34.44*	282.6	79.49*
	CK	120	8.33	299.2	93.09
子二代 (F ₂)	LC ₇₀	240	15.00*	245.8*	93.09
	LC ₅₀	240	21.67*	231.2*	96.01
	LC ₃₀	180	12.22*	271.8	96.34
	CK	120	7.50	272.4	96.50
子三代 (F ₃)	LC ₇₀	240	4.16	267.1	92.52
	LC ₅₀	240	9.58	261.1	93.07
	LC ₃₀	180	17.78*	276.3	90.00
	CK	120	8.33	280.6	97.50
子四代 (F ₄)	LC ₇₀	240	6.67	256.9	93.24
	LC ₅₀	240	4.17	255.2	91.68
	LC ₃₀	180	4.44	256.3	90.89
	CK	120	6.67	255.2	93.94

表 4 表明, 病毒对子代寄生昆虫化蛹后蛹质量、化蛹率和幼虫死亡率等的影响总体上是随着传递代数的增加而减弱的, 结果如下:

子一代 (F_1) 寄主的幼虫死亡率随着感染浓度的增加而增大, 最高死亡率为 50.42%, 最低为 34.44%, 但均远高于对照的 8.33%。在蛹质量方面, 除对照 (299.2 mg) 比亲代 (303.6 mg) 略有下降外, 其他各处理与亲代相比均有不同程度的提高, 仍以 LC_{50} 最小, 为 242.9 mg, 明显低于对照的 299.2 mg, 但处理 LC_{30} (282.6 mg) 与对照却无明显差异。在化蛹率方面, 各处理与对照之间差异极显著, 均明显低于对照的 93.09%。需要说明的是处理 LC_{90} 由于亲代感染后残存的个体数较少, 再加上其化蛹率和成虫的产卵量低而导致不能正常传代。

子二代 (F_2) 中各处理的幼虫死亡率均明显低于 F_1 代, 最高为 21.67% (LC_{50}), 最低为 12.22%, 但仍都明显高于对照的 7.50%。在平均单头蛹质量方面, 处理 LC_{70} 和 LC_{50} 与对照差异极显著, 处理 LC_{30} 与对照无明显差异, 各处理中仍以 LC_{50} 最小, 为 231.2 mg。在幼虫化蛹率方面, 各处理与对照已无明显差异。

在子三代 (F_3) 中, 除了处理 LC_{30} 的幼虫死亡率 (17.78%) 和 LC_{50} 的平均单头蛹质量 (261.1 mg) 与对照存在显著差异外, 其他与对照均无明显差异。

在子四代 (F_4) 中, 各处理与对照在幼虫死亡率、平均单头蛹质量和幼虫化蛹率方面均无明显的差异。值得注意的是, 各处理在蛹质量、幼虫死亡率和化蛹率等方面与对照无差异时, 并不等于病毒对寄主不起作用。许多研究表明, 病毒是以某种未知的或亚致死剂量方式存在昆虫体内, 等待环境或外界中某些条件的刺激或诱发而导致病毒病的发生和流行, 因此, 从某种意义上讲, 亚致死剂量的感染更有意义^[9]

2.4 对子一代 (F_1) 虫卵和蛹的 PCR 检测结果

以子一代 (F_1) 棉铃虫卵、蛹的总 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物经 1.2% 琼脂糖电泳检测, 在接近 400 bp 处有一条明显的扩增带 (图 3)。对扩增产物的克隆和测序证实片段大小为 389 bp (图 4), 与设计的大小完全一致。通过 BLASTN 进行序列同源性比较发现, 所测序列与中国科学院武汉病毒研究所陈新文^[10]等的报道完全一致。所测的 389 bp 中仅有 1 bp 不同, 从而证明了扩增片段是棉铃虫核型多角体病毒的多角体蛋白基因。

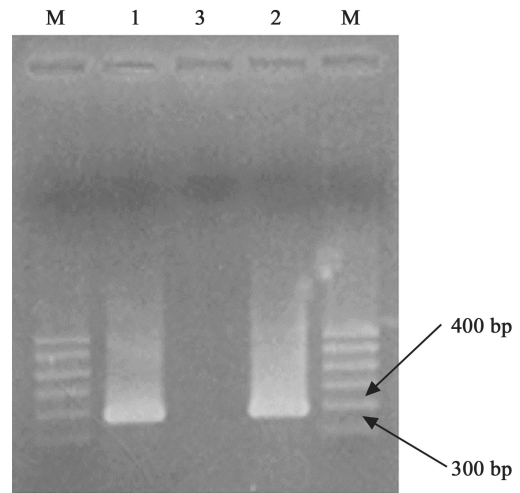


图 3 PCR 扩增结果

M: Marker 1: 卵 2: 蛹 3: 健康

```
5-GTTAAGCCCCGACACAATGAAGCTTGTA GTTAA
CTGGAGCGGTCGCGAATTTCTTCGCGAAACTTGGA
CGCGTTTCA TGGAAGACAGTTTTCCCATTTGTAGACC
ACCAAGAAA TTA TGGA CGTGTTCCTGTCTGTTAATA
TGCGACCAACCAAACCGAACCGTTGTTA CCGA TTC
TTAG CG CAA CA CGCTCTCGCTGTGTGATCCGA CTA
TATTCCTCA CGAAGTCA TTCGTATTGTAGAA CCTTC
CTATGTAGGCAGTAACAA CGAGTACAGAATTAGTT
TAGCCAAAAAATA CGG CGGTTGTCCCGTTA TGAA CT
TGCA CGCTGAATACA CTAATTCCTTTGAAGATTTTCAT
TACCAACGTAATTTGGGAGAA CTTTTACAAACCAAT-3
```

图 4 HaNPV 多角体蛋白基因 PCR 扩增片段的测序结果

3 结论和讨论

(1) 对 HaNPV 的毒力测定结果表明该病毒株系的毒力较高, 以 3 龄末的棉铃虫为试虫, 其 LC_{50} 为 3.44×10^4 PIB \cdot mL⁻¹; LT_{50} 随着感染浓度的增大而减小, 当感染浓度为 1.0×10^7 PIB \cdot mL⁻¹ 时, 其半致死时间为 4.77 d 当感染浓度为 1.0×10^5 PIB \cdot mL⁻¹ 时, 半致死时间延长为 6.63 d。采用人工饲料代替天然饲料的办法来测定病毒株系的毒力, 具有简单易行、便于操作等优点, 而且可避免其它不稳定因素的干扰, 但由于人工饲料块太小容易干燥而影响供试幼虫的取食, 最终将影响结果的可靠性, 因此, 采用该方法时, 一定要让试虫经过预饥饿处理并适当延长虫龄, 使试虫尽可能在短的时间内取食完饲料, 从而获得准确可信的结果。

(2) 亲代被感染后, F_1 代中各处理的幼虫死亡

率非常明显 (34.44% ~ 50.42%) 且随着最初感染浓度的增大而增加。在 F_2 代中, 处理 LC_{50} 的幼虫死亡率最大 (21.67%), 而 F_3 代中则以低浓度处理 LC_{30} 的幼虫死亡率最大 (17.78%), F_4 代中各处理和对照差异不显著。由此可见, 以高浓度的病毒防治害虫, 可有效降低亲代和 F_1 代的虫口密度但不利于病毒在种群中的持续扩散, 而低浓度的处理虽有利于病毒的持久传递却不能有效控制当代的虫口密度, 因此在重要食叶害虫的综合治理中, 可考虑采用既能有效降低当代虫口密度、又有利于病毒持久传递的适宜浓度, 这样既节约了成本, 又有利于保持生态系统的稳定性。

(3) 在蛹质量方面, 以处理 LC_{50} 最为明显, 在继 F_0 代后的连续三代中均明显低于对照, 高浓度的处理 LC_{70} 只有在 F_1 和 F_2 代中明显低于对照, 而低浓度的处理 (LC_{30}) 对子代的蛹质量则没有影响。席景会等^[10] 在研究八字地老虎核型多角体病毒 (*Amathes c-nigrum* nuclear polyhedrosis virus AnNPV) 对寄主昆虫繁殖潜能的影响中发现, 雌蛹质量和成虫的产卵量有显著的相关性, 蛹质量越低, 成虫卵量越少。至于蛹质量和羽化率是否有关, 在蛹质量方面是否存在某个临界值, 只有高于该阈值的蛹才能正常羽化, 而低于该数值则不能羽化, 以及寄主接毒后对子代成虫的飞翔能力是否有影响等, 这些问题仍有待于进一步研究验证。

(4) 从化蛹率方面看, 亲代和 F_1 代中各处理与对照差异显著, 尤其是亲代的高浓度处理与对照差异极显著, 但其他各代则与对照无显著差异; 与幼虫死亡率、蛹质量参数相比, 病毒对寄主化蛹率的持久影响相对较小。

(5) 在试虫的传代饲养过程中, 并没有发现病毒流行病的大发生而导致传代失败, 因此可以说明, 病毒的垂直传递仅是流行病发生条件之一。

参考文献:

- [1] 冀卫荣, 刘贤谦, 师光禄. 核型多角体病毒杀虫剂的开发 [J]. 山西农业大学学报, 1998, 18(4): 302~305
- [2] 张忠信, 张光裕, 彭辉银, 等. 棉铃虫核型多角体病毒在生态环境中的滞留及作用 [J]. 中国病毒学, 1995, 10(1): 56~60
- [3] 曲良建, 张永安, 王玉珠, 等. PCR法证实棉铃虫核型多角体病毒对棉铃虫经卵和蛹的垂直传递 [J]. 中国生物防治, 2005, 21(1): 45~48
- [4] 范贤林, 卢美光, 孟香清, 等. 棉铃虫室内饲养技术的改进 [J]. 昆虫知识, 2003, 40(1): 85~87
- [5] 梁革梅, 谭维嘉, 郭予元. 人工饲养棉铃虫技术的改进 [J]. 植物保护, 1999, 25(2): 15~17
- [6] Hughes D S, Possee R D, Ling L A, et al. Activation and detection of a latent baculovirus resembling *Mamestra brassicae* nuclear polyhedrosis virus in *M. brassicae* insect [J]. Virology, 1993, 194: 608~615
- [7] Charpentier G, Desmarteaux J P, Bellon S, et al. Utilization of the polymerase chain reaction in the diagnosis of nuclear polyhedrosis virus infections of gypsy moth (*Lymantria dispar*, Lep., Lymantriidae) populations [J]. J Appl Ent, 2003, 127: 405~412
- [8] 祁学忠, 孟小林, 朱应, 等. PCR法证实 AnNPV 对小菜蛾的经卵传播 [A]. 见: 张芝利, 朴永范, 吴钜文. 中国有害生物综合治理论文集 [C]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 1098~1101
- [9] 段立清. 昆虫病毒对鳞翅目食叶害虫的亚致死作用 [J]. 中国森林病虫, 2002, 21(3): 33~35
- [10] 陈新文, 胡志红, Vak J M, 等. 中国棉铃虫单粒包埋核型多角体病毒多角体蛋白基因的序列分析 [J]. 中国病毒学, 1997, 12(4): 346~353
- [11] 席景会, 潘洪玉, 刘伟成, 等. 八字地老虎核型多角体病毒对寄主昆虫繁殖潜能的影响 [J]. 中国病毒学, 2000, 15: 76~79