

舞毒蛾核型多角体病毒室内增殖的研究

梁洪柱, 陈倩*, 田会鹏, 梁晓梅

(北京市西山试验林场,北京 100093)

摘要: 试验研究了饲毒龄期、饲毒浓度对舞毒蛾存活、幼虫体质量、虫尸质量和含毒量的影响以及饲毒时间对舞毒蛾含毒量的影响。结果表明:饲毒龄期和饲毒浓度对幼虫存活率和体质量增长均有不同程度的影响,饲毒龄期越小、饲毒浓度越高,死亡时间越早,死亡率越高,体质量增长越缓慢;而且饲毒时龄期越小、饲毒浓度越高,虫尸质量也越小,其含毒量也越低。饲毒时间与含毒量成抛物线型,饲毒时间过短或过长,体内含毒量均较低。由于5龄幼虫饲毒后有78%以上个体发育至蛹期,不发生死亡现象,因此,室内增殖舞毒蛾核型多角体病毒时,应选取4龄初幼虫喂饲 1.0×10^6 PIB · mL⁻¹ 病毒为宜,接毒10 d后开始收集饲毒幼虫。

关键词: 舞毒蛾;舞毒蛾核型多角体病毒;增殖

中图分类号:S763

文献标识码:A

Study on the Mass Propagation of *Lymantria dispar* Nuclear Polyhedrosis Virus(LdNPV) and Its Application

LIANG Hong-zhu, CHEN Qian, TIAN Hui-peng, LIANG Xiao-mei

(Beijing Experimental Forest Farm, Beijing 100093, China)

Abstract: The influence of instar of the host larvae and the concentration of *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus (LdNPV) on larvae survival rate, larvae mass, dead body mass and the mean number of LdNPV per larval of dead body were studied. And also, the effect of feeding time on the toxicity of LdNPV was studied. The results indicated that the influence of host larvae and the concentration of LdNPV on the survival rate and larvae mass were significantly different among individuals. The younger the instar of the host larvae, the higher the concentration of LdNPV, the earlier the dead time, the higher the mortality rate, the slower the body mass' increase and the lower the toxicity. The relationship between the feeding time and the concentration of LdNPV followed a parabolic curve, i. e. both the shorter or longer time resulted in lower LdNPV concentration. It was proved that the 2nd or the 5th larvae after feeding with LdNPV (78%) were not suitable for LdNPV production, so the authors believe that the 4th instar larval fed with virus at the 1.0×10^6 PIB · mL⁻¹ concentration for 10 days is the most suitable condition for the mass production of LdNPV in laboratory.

Key words: *Lymantria dispar*; *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus(LdNPV); mass propagation

舞毒蛾(*Lymantria dispar* L.)是重要的森林害虫,早已引起世界各国的高度重视。近百年来,人们采取了多种方法对舞毒蛾进行防治,其中,利用核型多角体病毒(NPV)是防治舞毒蛾重要的方法^[1]。舞

毒蛾核型多角体病毒(*Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus, LdNPV)是影响舞毒蛾种群动态的主要因子之一,常引起舞毒蛾种群数量的急剧下降,在世界各地的防治中均取得了良好效果^[2]。1915年

收稿日期:2013-03-15

作者简介:梁洪柱(1965—),北京人,高级工程师,主要从事林业病虫害生物防治研究、推广与应用。

* 通讯作者;E-mail: whiteflycq@126.com.

Glaser 等^[3]首先报道舞毒蛾病毒病的症状与家蚕黄疸病一样,主要感染宿主的真皮、脂肪体、气管基底膜和血细胞,直至 1948 年 Bergold^[4]才证实舞毒蛾核型多角体病毒(LdNPV)的病源性。

国外对 LdNPV 的应用研究较早,20 世纪 60 年代初开始利用舞毒蛾病毒进行林间防治,并取得较为理想的效果^[5-7]。1985—1987 年斯洛伐克应用美国的注册商品 NPV(商品名 Gypchek)和当地的舞毒蛾 NPV 防治舞毒蛾幼虫,杀虫效果分别为 95% 和 93%^[8]。Cunningham 等^[8]1991 年在加拿大用飞机喷洒舞毒蛾 NPV 防治 1 龄幼虫,剂量为 1.25×10^{11} PIB · hm⁻²,3 d 后再喷 1 次,效果良好。Podgwaite 等^[8]1993 年在美国弗吉尼亚利用飞机喷洒该病毒防治舞毒蛾幼虫,用量为 1.25×10^{10} PIB · hm⁻²,防治区面积 73.2 hm²,下一代卵块减少 92%。

国内对舞毒蛾 NPV 的研究,许文儒等^[9]1979 年报道用每毫升含 82 ~ 320 万多角体虫尸液防治 1 ~ 3 龄舞毒蛾幼虫,效果达 81% ~ 98%;岳书奎等^[10]1984 年用飞机喷洒核型多角体病毒防治舞毒蛾,害虫死亡时间较长,需 32 d 左右,杀虫效果可稳定在 85% ~ 90%;赵连吉^[11]1994 和 1995 年通过野外采毒,提取应用的方法,利用该病毒在吉林省公主岭市开展 2 年试验防治舞毒蛾,防治面积达 113.3 hm²,试验范围达 23 个乡镇,取得了良好的防治效果,害虫死亡率均达 78% 以上,最高可达 93.2%,挽回经济损失 52 万元,净获经济效益 47.75 万元。周建华^[12]用细胞遗传学方法观察诱发染色体受损伤时所出现的无着丝点断片进入细胞分裂间期所形成微核的结果,证明该病毒杀虫剂对小白鼠的染色体没有表现致变效应,从遗传学的角度证实舞毒蛾核型多角体病毒杀虫剂对小白鼠是安全的。试验证明,LdNPV 对舞毒蛾不但有良好的防治效果,且对哺乳动物无不良影响,值得推广使用。目前,舞毒蛾核型多角体病毒在舞毒蛾幼虫体内复制最为经济,且舞毒蛾人工饲养技术已成功解决,但利用人工饲料饲养的舞毒蛾接毒龄期、接毒浓度、接毒时间对舞毒蛾生长、发育、存活及病毒复制量是否存在影响还未见报道。因此,本研究对舞毒蛾病毒复制最佳幼虫龄期、接毒浓度、接毒时间等进行试验筛选。通过试验完善了舞毒蛾核型多角体病毒工厂化生产流程与方法,提高了舞毒蛾病毒产量,降低了生产成本,为野外大面积推广应用舞毒蛾核型多角体病毒防治舞毒蛾奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫和病毒

1.1.1 舞毒蛾 2010 年 4 月在内蒙古赤峰市乌兰察布林区采集舞毒蛾卵块,卵块用 10% 甲醛溶液消毒,将同一时期孵出的活泼的 1 龄幼虫作为供试昆虫。

1.1.2 LdNPV 虫尸保存 2000 年北京市西山试验林场生防中心在北京市房山区林区采集带 LdNPV 的舞毒蛾虫尸, -10 °C 冰柜保存备用。

1.1.3 LdNPV 母液的制备 称取舞毒蛾虫尸 30 g,加入 50 mL 蒸馏水,放入组织捣碎匀浆机中打匀成浆,并用 3 层纱布过滤,将滤液倒入 50 mL 的离心管中,4 000 r · min⁻¹离心 10 min 去上清液,沉淀(此沉淀上部为淡褐色的 LdNPV,底部为黑色杂质)加入 30 mL 蒸馏水轻轻摇动,将淡褐色 LdNPV 溶解,弃底部黑色杂质。将 LdNPV 液体倒入新离心管中进行二次离心,离心完成后倒掉上清液,留下的沉淀加入 20 mL 蒸馏水轻轻摇动,将上部淡褐色 LdNPV 溶解,并将液体倒入新离心管中,弃底部黑色杂质,此时得到的液体为纯度极高的 LdNPV 原液。然后利用无菌水将上述原液配成浓度为 1.0×10^9 PIB · mL⁻¹ 的母液。

1.2 饲毒龄期对舞毒蛾幼虫存活的影响及虫尸质量与病毒含量关系分析

将 1.1.3 节中 LdNPV 母液稀释 1 000 倍,倒入盛有新鲜人工饲料(2 g · 杯⁻¹)的透明塑料养虫杯(底直径 3.5 cm,顶直径 5.0 cm,杯高 5 cm)内(平均每杯饲料浸透 2 mL 病毒液),将多余液体倒出,放于养虫室内待用。将体质量近似的单头舞毒蛾 2、3、4、5 龄幼虫,放于上述养虫杯中,盖盖后倒置于饲养筐内,置于养虫室内饲养。室内平均温度 25.0 °C,相对湿度 60%,光照:黑暗 = 16:8。每 24 h 清理 1 次虫粪并记录幼虫体质量,且每 5 d 更换 1 次新鲜人工饲料,直至舞毒蛾完全死亡或化蛹,及时收集虫尸并称质量,测病毒多角体含量,每项处理重复 200 次。以浸清水的新鲜人工饲料喂饲 2 ~ 5 龄幼虫为对照(CK)。统计分析饲毒龄期对舞毒蛾幼虫体质量的影响及虫尸质量与病毒含量之间的关系。

1.3 饲毒浓度对舞毒蛾幼虫存活的影响及虫尸质量与病毒含量关系分析

将 1.1.3 节中 LdNPV 母液分别稀释至 1.0×10^8 、 1.0×10^7 、 1.0×10^6 、 1.0×10^5 、 1.0×10^4 、 $1.0 \times$

$10^3 \text{ PIB} \cdot \text{mL}^{-1}$ 后,分别取 2 mL 病毒液倒入上述养虫杯内,并放于养虫室内,人工饲料阴干后放入 1 头 4 龄初舞毒蛾幼虫,试验条件与方法同上,不同处理重复 200 次。以浸清水处理为对照(CK)。统计分析饲毒浓度对舞毒蛾体质量的影响及虫尸质量与病毒含量之间的关系。

1.4 饲毒时间对舞毒蛾含毒量的影响

将 1.1.3 节中 LdNPV 母液稀释至 $1.0 \times 10^6 \text{ PIB} \cdot \text{mL}^{-1}$,倒入盛有新鲜人工饲料的透明塑料养虫杯内,将多余液体倒出,置于养虫室内,人工饲料阴干后放入 1 头 4 龄幼虫,试验条件同上。分别在饲养第 6、8、10、12、14 天时各收集 50 头幼虫,称幼虫质量后测其病毒多角体含量。统计分析饲毒时间对其体质量的影响及虫尸质量与病毒含量之间的关系。

1.5 舞毒蛾核型多角体病毒含量测定

分别选取 1.2、1.3、1.4 节不同处理中的舞毒蛾各 50 头,用 1.1.3 节方法提取病毒。取 1 mL 提取液稀释 1 000 倍,然后取 1 mL 稀释液滴于血球计数板上,在光学显微镜 10 倍镜头下寻找血球计数板的方格条,然后在 40 倍镜头下沿血球计数板方格对角线进行病毒颗粒体计数,其中,在血球计数板每一小方格线上的病毒颗粒体,按固定的两条边线进行计数,重复测定 4 次。病毒多角体含量 = 4 次病毒颗粒体计数之和 $\div 80 \times 4.0 \times 10^6 \times 1\ 000$,单位: $\text{PIB} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.6 数据分析

用 SPAS 软件对上述数据进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 饲毒龄期和浓度对舞毒蛾幼虫存活的影响

2.1.1 饲毒龄期对舞毒蛾幼虫存活的影响 从图 1 可以看出:饲毒浓度一致时,饲毒龄期对舞毒蛾幼虫存活率影响较大;龄期越大,饲毒后幼虫开始死亡的时间越长,且全部死亡的时间也越长,即取食的时间越长,有利于幼虫体质量的生长;而低龄幼虫,如 2 龄幼虫,饲毒后 9 天内即全部死亡,死亡时体质量较轻,病毒获得量较少,不利于工厂化病毒的生产。5 龄幼虫喂饲 9 天后有 78% 的个体发育至蛹,也不利于病毒的复制。

2.1.2 饲毒浓度对舞毒蛾幼虫存活的影响 由图 2 可知:饲毒浓度对 4 龄舞毒蛾幼虫存活率存在一定的影响,饲毒浓度越大,幼虫发生死亡的时间越

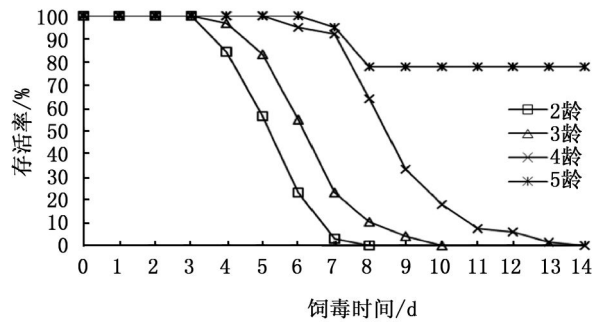


图1 饲毒龄期对舞毒蛾幼虫存活率的影响

短,且全部死亡的时间也越短。4 龄幼虫喂饲 $1.0 \times 10^3 \text{ PIB} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度的病毒后,幼虫自第 11 天开始死亡,至第 21 天全部死亡;而喂饲 $1.0 \times 10^8 \text{ PIB} \cdot \text{mL}^{-1}$ 病毒后,第 5 天即开始死亡,第 11 天时已完全死亡。对照存活率为 100%,全部正常化蛹。

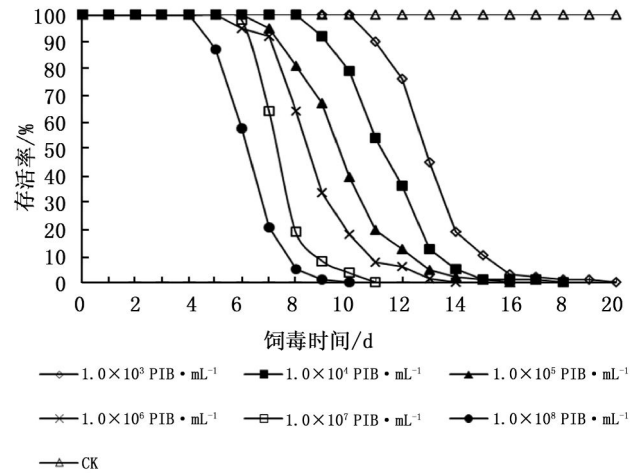


图2 饲毒浓度对舞毒蛾幼虫存活率的影响

2.2 饲毒龄期和浓度对舞毒蛾幼虫体质量的影响

2.2.1 饲毒龄期对舞毒蛾幼虫体质量的影响

不同龄期舞毒蛾幼虫饲喂病毒后的虫体质量变化见图 3。CK 幼虫在喂饲后第 6 天体质量开始快速增长,其他各龄期幼虫饲毒后虫体质量也呈增长趋势,但均明显低于 CK,尤其是 2、3 龄幼虫,虫体质量增长极为缓慢,说明饲毒后的病毒对舞毒蛾各龄期幼虫体质量增长均有不同程度的抑制,龄期越小抑制越显著。5 龄幼虫喂饲一段时间后开始化蛹,4 龄幼虫饲毒后虫体质量增长最多,其次为 3、2 龄幼虫。

2.2.2 饲毒浓度对舞毒蛾幼虫体质量增长的影响

由图 4 可以看出:喂饲 $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^8 \text{ PIB} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度病毒后,舞毒蛾幼虫体质量均呈增长趋势,但喂饲浓度越高,舞毒蛾幼虫死亡时间越早,死

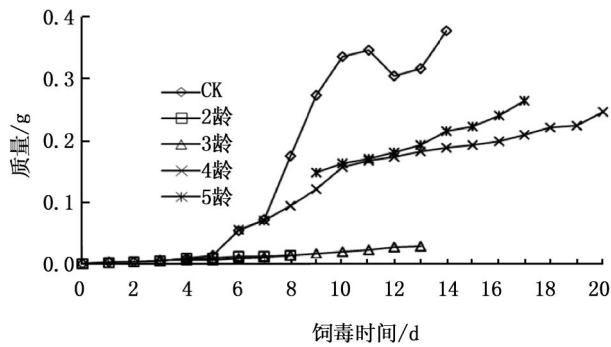


图3 饲毒龄期对舞毒蛾幼虫体质量的影响

亡时虫体质量也越轻,说明饲毒浓度越高,越抑制舞毒蛾幼虫的取食,从而影响其死亡时的虫体质量。

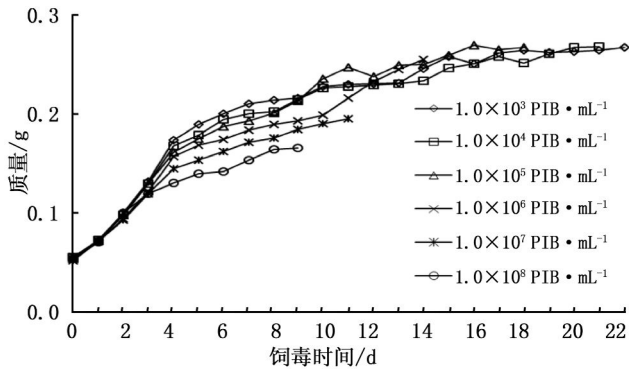


图4 饲毒浓度对舞毒蛾幼虫体质量的影响

2.3 舞毒蛾饲毒虫尸质量与病毒含量关系分析

2.3.1 饲毒龄期对舞毒蛾虫尸质量和病毒含量的影响 由表1可见:饲毒龄期与虫尸质量成正相关,饲毒龄期越大,死后尸体质量越重,其中,2、3龄幼虫饲毒后虫尸体质量间差异不显著,单头质量均不超过0.03 g;而4、5龄饲毒幼虫虫尸质量与2、3龄的差异显著,单头虫尸质量均超过0.2 g。由表1还看出:虫尸质量越大,病毒多角体含量越多,虫尸内病毒多角体含量与虫尸体质量也成正比。由于5龄幼虫饲毒后,接近80%的个体发育为蛹,因此,室内增殖病毒时,以4龄幼虫为饲毒虫最佳。

表1 饲毒龄期对舞毒蛾虫尸质量和病毒含量的影响

饲毒龄期/龄	虫尸质量/(g·头 ⁻¹)	病毒含量/(×10 ⁹ PIB·头 ⁻¹)
2	0.014 5b	0.73b
3	0.029 3b	1.84b
4	0.246 8a	15.68a
5	0.265 0a	15.87a

注:表中同列不同字母表示5%水平上差异显著;下同。

2.3.2 饲毒浓度对舞毒蛾虫尸质量和病毒含量的影响 饲毒浓度同饲毒龄期一样,对舞毒蛾虫尸质

量和病毒含量有较大影响(表2)。当饲毒浓度超过 1.0×10^6 PIB·mL⁻¹时,会明显抑制舞毒蛾幼虫体质量的增长,虫尸内病毒含量相应下降。饲毒浓度低于 1.0×10^6 PIB·mL⁻¹(含 1.0×10^6 PIB·mL⁻¹)时,幼虫死亡后虫尸质量无显著差异,单头虫尸质量均在0.25~0.27 g间,体内病毒含量也无显著差异;但饲毒浓度越低,舞毒蛾幼虫80%以上个体死亡的时间越长,最长可达19 d,延长了病毒生产时间,相应增加生产成本。因此,室内增殖LdNPV时, 1.0×10^6 PIB·mL⁻¹饲毒浓度最佳。

表2 饲毒浓度对舞毒蛾虫尸质量和病毒含量的影响

饲毒浓度/(PIB·mL ⁻¹)	虫尸质量/(g·头 ⁻¹)	病毒含量/(×10 ⁹ PIB·头 ⁻¹)	80%个体死亡时间/d
1.0×10^3	0.252 6a	14.26a	18a
1.0×10^4	0.268 7a	15.32a	19a
1.0×10^5	0.266 8a	16.27a	13b
1.0×10^6	0.254 7a	16.24a	11bc
1.0×10^7	0.194 8ab	11.28b	9cd
1.0×10^8	0.165 4b	9.43c	8d
Ck	化蛹	0.00d	-

2.3.3 饲毒时间对舞毒蛾体质量和病毒含量的影响 由表3可以看出:饲毒6~10 d内幼虫体质量呈上升趋势,至第10天达到最高,为0.264 6 g·头⁻¹;随着饲毒时间的延长,幼虫体质量反而下降。幼虫体内病毒含量变化趋势同体质量一致,在饲毒6~10 d内,幼虫体内病毒含量随饲毒时间的延长而增加;在饲毒10~14 d内,幼虫体内病毒含量随饲毒时间的延长而下降。主要因为,饲毒时间过短,幼虫体质量还未发育到最大龄期,所以体质量较低,体内病毒量较少;饲毒时间过长,部分死亡的幼虫体壁破裂,体内病毒汁液流出,因此,体质量反而下降,体内病毒含量降低。因此,最佳饲毒时间为10 d。

表3 饲毒时间对舞毒蛾体质量和病毒含量的影响

饲毒时间/d	体质量/(g·头 ⁻¹)	病毒含量/(×10 ⁹ PIB·头 ⁻¹)	死亡率/%
6	0.154 7c	1.56d	5
8	0.238 4a	11.27b	36
10	0.264 6a	15.46a	82
12	0.201 4b	10.74b	94
14	0.146 8c	4.03c	100

3 结论与讨论

从上述试验可以看出:饲毒龄期、浓度和时间均可影响LdNPV的室内增殖,其中,饲毒龄期低于4龄时,幼虫体质量增加速率缓慢,虫尸质量也越小,

从而影响最终的病毒获得量;若龄期太高(5龄),绝大部分个体发育至蛹期,最终也影响病毒的产量。这一结果与陶万强等^[13]室内人工饲养杨扇舟蛾增殖杨扇舟蛾颗粒体病毒结果一致,饲毒时以4龄幼虫最佳。

饲毒浓度对舞毒蛾幼虫体质量、虫尸质量及含毒量也存在一定影响。饲毒浓度高于 1.0×10^6 PIB \cdot mL⁻¹时,会抑制幼虫取食,促进幼虫死亡的速度,从而影响体质量增长,虫尸质量也越低;饲毒浓度低于 1.0×10^6 PIB \cdot mL⁻¹时,最终死亡幼虫体质量同此浓度无显著差异,但死亡时间增加4~8 d,从而增加1次喂饲次数,提高人工饲养成本。饲毒浓度以 1.0×10^6 PIB \cdot mL⁻¹最佳。

1.0×10^6 PIB \cdot mL⁻¹浓度饲毒4龄幼虫后,应于饲毒的第10天开始收集饲毒虫,此时饲毒虫体质量最高,体内病毒含量也最高。

1985年,胡萃等^[14]曾报道,在大菜粉蝶颗粒体病毒室内增殖时,幼虫死亡时体质量越重,体内病毒含量越高,二者成正比。陶万强等^[13]2009年以杨扇舟蛾为材料,室内增殖杨扇舟蛾颗粒体病毒时也得到了相同结论。本试验也证明,在饲毒浓度固定的情况下,舞毒蛾核型多角体病毒的产量与死亡时体质量成正比,因此,笔者在生产病毒时应尽可能增加幼虫的体质量。

此外,陶婧等^[15]最新研究,根据舞毒蛾核型多角体病毒的蜕皮甾体尿苷二磷酸葡萄糖基转移酶基因(*egt*)设计一对特异性引物,成功建立LdNPV的PCR检测技术体系,此技术不但能对实验室种群病毒感染检测和林间舞毒蛾病毒流行病检测,同时也可以用于林间舞毒蛾核型多角体病毒在环境中存留跟踪研究。这将为舞毒蛾核型多角体病毒野外防治舞毒蛾的应用范围和应用量等提供更切实的数据支撑。

参考文献:

- [1] 林同,刘宽余,王志英,等. 舞毒蛾核型多角体病毒的基因及其在害虫防治中的应用[J]. 东北林业大学学报,2002,30(2): 24-29
- [2] 朱丽春,段立清,特木钦,等. 舞毒蛾核型多角体病毒3个地理品系的毒力比较[J]. 中国森林病虫,2008,27(5):4-6
- [3] Glaser R W, Chapman J W. A preliminary list of insects which have wilt[J]. Journal of Economic Entomology,1915(6):479-488
- [4] Bergold G H. The nature of nuclear polyhedrosis virus[M]//Steinhaus E A. Insect Pathology. New York:Academic Publishers,1963, 1:417
- [5] Doane C C. Bioassay of nuclear polyhedrosis virus against larval insect of the gypsy moth[J]. Journal of Invertebrate Pathology,1967(9):376-386
- [6] Rollinson W D, Lewis F B, Waters W E. The successful use of a nuclear polyhedrosis virus against gypsy moth[J]. Journal of Invertebrate Pathology,1965(7):515-517
- [7] Magnoler A. Bioassay of a nuclear polyhedrosis virus gypsy moth[J]. Journal of Invertebrate Pathology,1974,23(1):190-196
- [8] 王丽君. 舞毒蛾人工饲养及NPV生产应用的研究[C]. 哈尔滨:东北林业大学,2002
- [9] 许文儒,高三俊,李敬涛. 用核型多角体病毒防治舞毒蛾的研究[J]. 蚕业科学,1979,5(3):129-133
- [10] 岳书奎,侯爱菊,王志英,等. 飞机喷洒舞毒蛾核多角体病毒(NPV)防治舞毒蛾的试验[J]. 东北林业大学学报,1984,12(2):21-26
- [11] 赵连吉. 舞毒蛾核多角体病毒在林业上的应用[J]. 吉林林业科技,1996(12):49,44
- [12] 周建华. 舞毒蛾核型多角体病毒杀虫剂对小白鼠的安全试验[J]. 四川林业科技,2000,21(3):42-43
- [13] 陶万强,潘彦平,王金利,等. 杨扇舟蛾颗粒体病毒室内增殖的研究[J]. 中国森林病虫,2009,28(3):9-10,18
- [14] 胡萃,赵典虞,万兴生. 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[J]. 浙江大学学报,1985,11(2):129-133
- [15] 陶婧,韩崇选,张永安,等. 舞毒蛾核型多角体病毒PCR检测技术的建立[J]. 林业科学研究,2012,25(5):616-619