

大豆叶毒蛾核型多角体病毒 (OaNPV)的毒力测定*

何 力 张履鸿

(东北农学院)

摘 要

1987年在哈尔滨从大豆叶毒蛾(*Orgyia antiqua* L.)感病致死幼虫体中分离出核型多角体病毒 OaNPV 一株。选1龄和3龄大豆叶毒蛾幼虫作试虫,分别用5个病毒剂量或浓度,采用定量滴叶法进行毒力测定。对应用感染剂量和感染浓度二种计量方法进行分析 and 比较。1龄幼虫感染剂量或浓度与死亡率回归直线方程分别为 $y_1 = 4.94 + 0.67x_1$ 和 $Y_1 = 3.58 + 0.67X_1$, 致死中量(LD₅₀)为1.2 PIB/虫, 致死中浓度(LC₅₀)为 1.4×10^2 PIB/ml; 3龄幼虫感染剂量或浓度与死亡率回归直线方程分别为 $y_3 = 3.80 + 0.49x_3$ 和 $Y_3 = 3.01 + 0.49X_3$, 致死中量为 2.6×10^2 PIB/虫, 致死中浓度为 1.1×10^4 PIB/ml。以 1.026×10^2 、 1.026×10^4 、 1.026×10^5 PIB/ml 病毒分别处理1龄幼虫所得致死中时(LT₅₀)分别为8.9、5.7和4.5天; 以 1.026×10^2 、 1.026×10^4 和 1.026×10^6 PIB/ml 病毒分别处理3龄幼虫所得致死中时分别为9.4、8.4和4.9天。结果看出 OaNPV 对大豆叶毒蛾的毒力较高, 对用于该虫防治实践具有潜力。

关键词 大豆叶毒蛾;核型多角体病毒;毒力测定

大豆叶毒蛾(*Orgyia antiqua* L.), 又名古毒蛾, 广泛分布于东北、华北、内蒙、西北等地, 为大豆叶部害虫, 其它寄主包括苹果、梨等果树及多种林木。1988年6、7月间, 在内蒙古莫力达瓦达斡尔族自治县巴彦乡此虫危害大豆严重, 危害面积达1500亩, 虫口密度达4-6头/m²。在各省大豆栽培区, 也有不同程度发生。大豆叶毒蛾核型多角体病毒(OaNPV)属杆状病毒科(Baculoviridae)杆状病毒属(Baculovirus)的A亚组。国外对这种病毒已

* 本文于1989年5月13日收到。

This paper was received on May 13, 1989.

有记载^[4,5],1980年丁翠、蔡秀玉^[1]在国内首次发现。有关 OaNPV 的形态学以及病毒接种于幼虫时的病毒产量等方面国内外学者做过一些初步的报导^[1,2,3,6],但对其毒力的研究尚待深入。本文对 OaNPV 的毒力进行了测定,为利用病毒对大豆叶毒蛾进行生物防治提供依据。

一、材料与 方法

1. 供试病毒

1987年9月在东北农学院果园的冀太平果树上采到自然死亡的大豆叶毒蛾4龄幼虫,经鉴定,病原为核型多角体病毒(OaNPV)。将病死虫体研磨离心,用无菌水稀释沉淀至一定浓度,涂于大豆叶片上饲喂健康3龄和4龄幼虫,收集病毒感染致死虫体,研磨后3层纱布过滤,250转/分,离心3次,除去杂质;4000转/分,离心30分钟,弃去上清液,用无菌水反复冲洗数次得到多角体粗提液。加入青、链霉素(各200单位/ml)后放入0—4℃冰箱中备用。

2. 供试幼虫

将采集的大豆叶毒蛾越冬卵置冰箱0—4℃下保存。实验时,提前将卵取出,用1% NaOH 浸泡半分钟,经清水冲洗数次,再用3%甲醛液消毒20分钟,无菌水冲洗除药。阴干后,放入广口瓶中,在23℃下催孵。待孵化后,选同龄健康幼虫供试,每瓶饲养1龄或2龄幼虫30—50头,3龄以上幼虫10—20头。每天更换灭菌瓶和无菌新鲜大豆叶。

3. 毒力测定方法

毒力测定实验是在25±1℃、70—100% R. H.、自然光照、无菌的环境条件下进行。

实验设置6组。1组对照,5组处理。分别用5个不同剂量(或按浓度计)的病毒处理1龄幼虫(感染剂量: $9.44 \times 10^{-2} \sim 9.44 \times 10^2$ PIB/虫,或感染浓度: $1.026 \times 10^{-1} \sim 1.026 \times 10^5$ PIB/ml)和3龄幼虫(感染剂量: $2.57 \sim 2.57 \times 10^4$ PIB/虫,或感染浓度: $1.026 \times 10^{-2} \sim 1.026 \times 10^6$ PIB/ml)。单虫饲养,采用定量滴叶法,用微量注射器把确定了浓度和量的病毒悬液涂于一定面积的大豆叶片上,喂毒24小时后,除去没有吃掉全部叶片的幼虫,保证每次有食去全部供试叶片的试虫30头。逐日更换饲料,记录死虫,并镜检证实因病毒致死。实验重复一次,取两次实验数据的平均值,按 Abbott 公式算出校正死亡率,再将其转换为机率值,取剂量(或按浓度)的对数,用最小二乘法求死亡率机率值与剂量(或浓度)对数值的回归直线方程。经卡方检验适合后,求出 LD₃₀、LD₅₀、LD₇₀、LD₉₀、LC₃₀、LC₅₀、LC₇₀、LC₉₀和 LT₅₀值及相应的95%置信限。并按同理研究感染时间与死亡率的关系。

二、结果与 讨论

1. 感染剂量或浓度与死亡率的关系

分别用5种不同剂量(或按浓度计)的病毒,感染1龄和3龄大豆叶毒蛾幼虫,所得幼

虫死亡率列于表 1。感染剂量(或浓度)与死亡率关系的函数图象及回归直线方程见图 1。方程经卡方检验结果适合,由方程求出幼虫死亡率达到 30%、50%、70%、90%所需的感染剂量(或浓度)及 95%置信限,见表 2。

表 1 1 龄、3 龄幼虫取食不同剂量或浓度病毒 10 天后的校正死亡率

Table 1 Corrected mortality of 1st and 3rd instar larvae infected with different virus dosage or concentration 10 days later

虫龄 Larvae instar	1					3				
感染剂量(PIB/虫) Infected dose (PIB/larva)	9.44 $\times 10^{-2}$	9.44 $\times 10^{-1}$	9.44	9.44 $\times 10$	9.44 $\times 10^2$	2.75	2.75 $\times 10$	2.75 $\times 10^2$	2.75 $\times 10^3$	2.75 $\times 10^4$
感染浓度(PIB/ml) Infected concentration (PIB/ml)	1.026 $\times 10$	1.026 $\times 10^2$	1.026 $\times 10^3$	1.026 $\times 10^4$	1.026 $\times 10^5$	1.026 $\times 10^2$	1.026 $\times 10^3$	1.026 $\times 10^4$	1.026 $\times 10^5$	1.026 $\times 10^6$
校正死亡率(%) Corrected mortality (%)	19.3	50.8	73.6	91.2	96.4	22.2	32.6	37.0	53.0	92.6

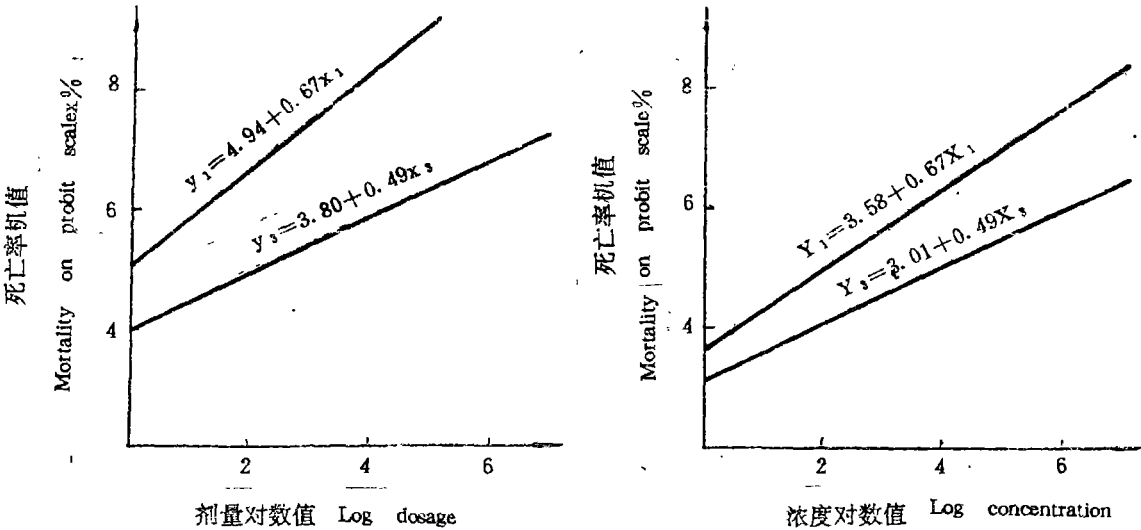


图 1 感染剂量或浓度与死亡率回归直线

Fig. 1 Regression equations of mortality against infected dosage or concentration

实验数据分析采用了感染剂量或浓度两种计量方法。

感染剂量按每虫食入多角体数计,可通过试虫食入叶片面积和涂在该叶片上病毒悬液的浓度求得,能较准确地反映病毒量与死亡率二者间的关系,便于不同虫龄幼虫对病毒易感性的比较。易于病毒对不同寄主侵染毒力的比较。

表 2 幼虫死亡率达到 30、50、70、90%所需感染量或浓度

Table 2 Virus dosage or concentration required for larva mortality reaching 30, 50, 70, 90% respectively

虫龄 Larvae instar	死亡率(%) Mortality (%)	感染剂量(PIB/虫) Infected dose (PIB/larva)	95%置信限 95% confidence limit	感染浓度(PIB/ml) Infected concentra- tion (PIB/ml)	95%置信限 95% confidence limit
1	30	2.0×10^{-1}	$8.2 \times 10^{-2} \sim 5.0 \times 10^{-1}$	2.2×10	$1.6 \times 10 \sim 2.9 \times 10$
	50	1.2	$5.2 \times 10^{-1} \sim 2.9$	1.4×10^2	$5.6 \times 10 \sim 3.2 \times 10^2$
	70	7.5	$3.1 \sim 1.8 \times 10$	8.3×10^2	$6.9 \times 10^2 \sim 9.8 \times 10^2$
	90	1.0×10^2	$2.7 \times 10 \sim 4.0 \times 10^2$	1.1×10^4	$7.6 \times 10^3 \sim 1.7 \times 10^4$
3	30	2.3×10	$6.3 \sim 8.4 \times 10$	9.2×10^2	$2.6 \times 10^2 \sim 3.4 \times 10^3$
	50	2.6×10^2	$9.5 \times 10 \sim 7.3 \times 10^2$	1.1×10^4	$3.8 \times 10^3 \sim 2.8 \times 10^4$
	70	3.0×10^3	$8.1 \times 10^2 \sim 1.1 \times 10^4$	1.2×10^5	$3.3 \times 10^4 \sim 4.4 \times 10^5$
	90	1.0×10^5	$1.0 \times 10^4 \sim 9.7 \times 10^5$	4.1×10^6	$4.5 \times 10^5 \sim 3.7 \times 10^7$

感染浓度按处理悬液每毫升含多角体数计,在一定叶面上涂一层已知浓度的病毒悬液力求使涂抹容量与生产实践上喷在单位叶表的有效量相当。本试验中系用与剂量等值的相应浓度值。用感染浓度计算死亡率便于生产实际应用。但有一定的局限性,由于幼虫所食表面具有一定浓度的病毒悬液的叶片面积不同而食入多角体数目不同,因此,如不明确单位面积叶表着落的病毒悬液容量,病毒浓度往往不能精确地反映病毒对供试或防治虫种的毒力。

由图 1 看出,以 1 龄幼虫感染剂量或浓度不同的计量法所得与死亡率的回归直线方程不同,分别为 $y_1 = 4.94 + 0.67x_1$ 与 $Y_1 = 3.58 + 0.67X_1$,对 3 龄幼虫分别为 $y_3 = 3.80 + 0.49x_3$ 与 $Y_3 = 3.01 + 0.49X_3$ 。但两对相应回归直线的斜率则相同,对 1 龄幼虫均为 0.67,对 3 龄幼虫均为 0.49。说明数据处理方法虽不同,但幼虫死亡率随剂量或浓度变化的总趋势一致。

从表 1 看出,随着感染剂量或浓度的增大,幼虫死亡率增高。对于同一感染剂量或浓度,1 龄幼虫死亡率高于 3 龄幼虫死亡率,幼虫对病毒的易感性随虫龄增加而下降。

由表 2 可见,1 龄幼虫的致死中量(LD₅₀)、致死中浓度(LC₅₀)分别为 5.2×10^{-1} PIB/虫和 1.4×10^2 PIB/ml。3 龄幼虫的致死中量、致死中浓度分别为 2.6×10^2 PIB/虫和 1.1×10^4 PIB/ml。比较 1 龄和 3 龄幼虫的 LD₅₀,1 龄幼虫对病毒的易感性比 3 龄幼虫高 217 倍;比较 LC₅₀,两龄期幼虫的易感性相差 79 倍。

从表 2 列出的达到 30%、50%、70%、90%幼虫死亡率所需感染剂量或浓度看出:要提高幼虫死亡率须相应提高剂量或浓度;对于不同龄期幼虫要达到同一死亡率,随虫龄增大所需剂量或浓度也增高。根据以上分析,在利用 OaNPV 对大豆叶毒蛾的防治实践中应尽早于幼龄期处理。

有些研究者测定了甘蓝夜蛾、天幕毛虫、粘虫的 NPV 对各原寄主 3 龄虫的 LD₅₀,分别为 5420、1405 和 175 PIB/虫;舞毒蛾 NPV 对 1 龄和 3 龄幼虫的 LD₅₀ 分别为 89 和

5600PIB/ml。以此种大豆叶毒蛾核型多角体病毒与所引研究资料相比较,OaNPV 对原寄主的毒力是比较高的,具有应用于防治实践的意义。

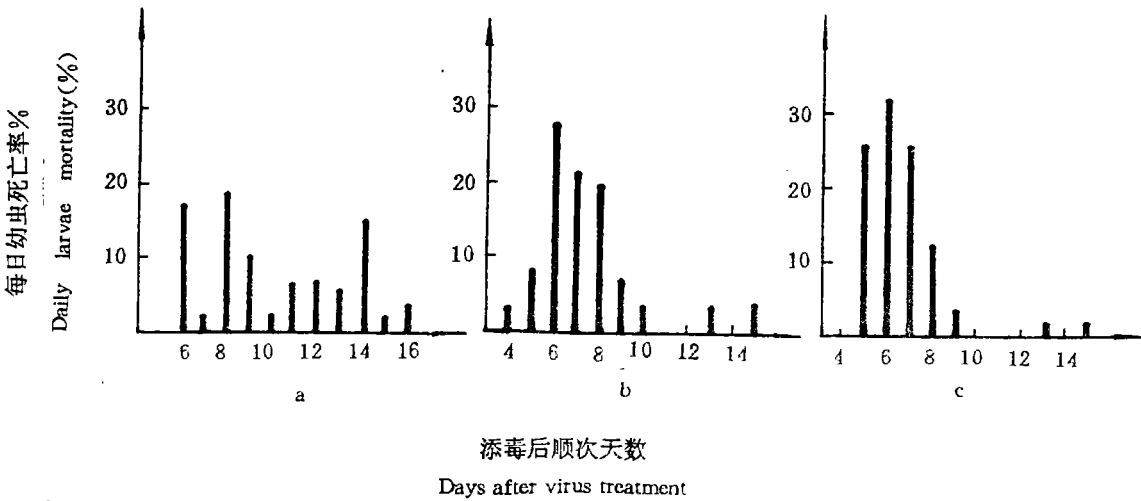
2. 感染时间与死亡率的关系

将感病天数换算成对数值,死亡率转换为机率值,分别求出感染 3 种浓度病毒的 1 龄和 3 龄幼虫的死亡率与感染天数回归直线方程,见表 3。由上述方程算出的致死中时(LT₅₀)及其 95%置信限见表 3。

表 3 不同浓度病毒对 1 龄和 3 龄幼虫的感染天数与死亡率回归直线方程及 LT₅₀值

Table 3 Regression equations of mortality against infected days and LT₅₀s for 1st and 3rd instar larvae infected with different virus concentrations

虫龄 Larva instar	感染浓度 1.026×(PIB/ml) Infected concentration 1.026×(PIB/ml)	LT ₅₀ (天) LT ₅₀ (day)	95%置信限(天) 95% confidence limit (day)	回归直线方程 Regression equations
1	10 ²	8.9	8.3—9.6	$Y_{1-2}=0.46+4.78X_{1-2}$
	10 ⁴	5.7	5.3—6.2	$Y_{1-4}=0.52+5.92X_{1-4}$
	10 ⁵	4.5	4.3—4.8	$Y_{1-5}=0.55+6.81X_{1-5}$
3	10 ²	9.4	8.6—10.3	$Y_{3-2}=1.43+3.67X_{3-2}$
	10 ⁴	8.4	7.7—9.1	$Y_{3-4}=1.10+4.22X_{3-4}$
	10 ⁶	4.9	4.4—5.4	$Y_{3-6}=1.72+4.75X_{3-6}$



a. 病毒浓度:1.026×10²PIB/ml b. 病毒浓度:1.026×10⁴PIB/ml c. 病毒浓度:1.026×10⁵PIB/ml
a. Virus concentration: 1.026×10²PIB/ml a. Virus concentration: 1.026×10⁴PIB/ml a. Virus concentration: 1.026×10⁵PIB/ml

图 2 1 龄幼虫每日死亡率与感染天数的关系

Fig. 2 Relationship between daily mortality and infected days for 1st instar larvae

从表3看出,随感染浓度的增加,LT₅₀值相应减小,即可缩短幼虫感病死亡时间。

感染浓度分别为 1.026×10^2 和 1.026×10^4 PIB/ml时,1龄幼虫的LT₅₀分别为8.9和5.7天。同样浓度,3龄幼虫的LT₅₀分别为9.4和8.4天,均较1龄幼虫LT₅₀天数增加。说明病毒感染潜伏期随虫龄增加而延长。

按感染浓度增高的顺序,1龄幼虫感染天数与死亡率回归直线方程的斜率分别为4.78、5.92和6.81。3龄幼虫的分别为3.67、4.22和4.75。看出同龄幼虫的感染天数与死亡率回归直线方程斜率随浓度增加而增加。也说明幼虫对病毒的易感性与感染浓度成正比。

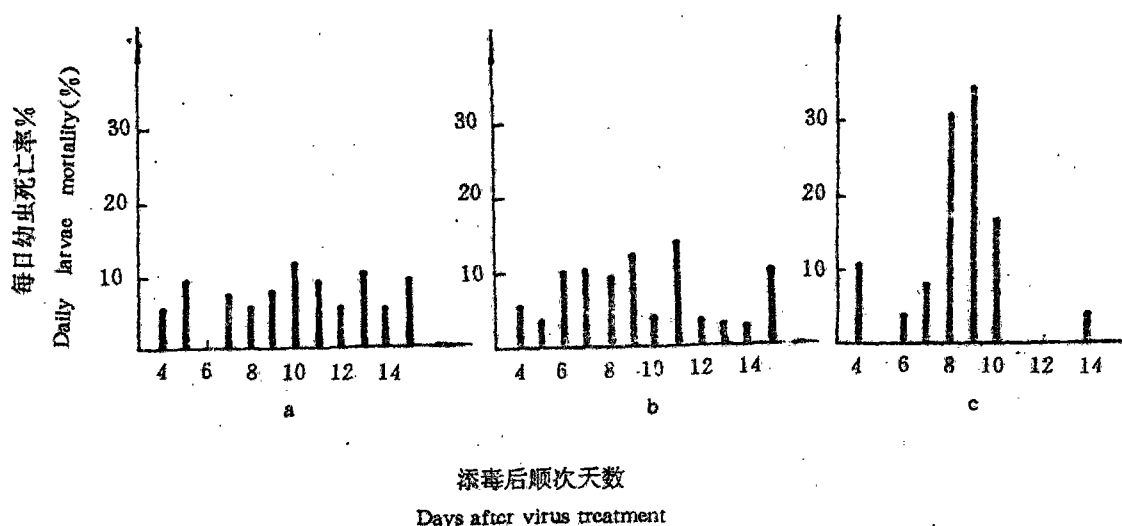


图3 3龄幼虫每日死亡率与感染天数的关系

Fig. 3 Relationship between daily mortality and infected days for 3rd instar larva

图2、图3分别表示1龄和3龄幼虫的每日死亡率与感染天数的关系。用病毒感染1龄幼虫,感染浓度为 1.026×10^2 PIB/ml时,幼虫从添毒后的第6天起陆续死亡,最高每日死亡率不超过20%(见图2a);感染浓度为 1.026×10^4 PIB/ml时,最高每日死亡率在25~30%之间,80%幼虫集中在前5天(从幼虫开始死亡算起)死亡(见图2b);感染浓度为 1.026×10^6 PIB/ml时,最高每日死亡率超过30%,80%幼虫集中在前3天死亡(见图2c)。3龄幼虫也有类似的情况(见图3)。可见在一定条件下,感染浓度增大,死亡时间的集中程度增高。

由本试验结果可以认为:大豆叶毒蛾对该种OaNPV易感。在一定条件下,感染剂量或浓度增加,同龄幼虫死亡率增大,致死中时(LT₅₀)缩短,对NPV易感性增强,死亡时间集中程度增高。幼虫虫龄增大,对病毒易感性降低,病毒感染潜伏期延长。

参考文献

- [1] 丁翠、蔡秀玉, 1980, 微生物学报, 20(2), 221
- [2] Ackermann, H. W. and Smirnov, W. A.; 1983, J. Invertebr Pathol., 41, 269—280
- [3] Atanasov, Anton.; 1984, Gorskostop Nauka, 21(6), 56—60
- [4] Bergold, G. H.; 1943, Biol. Zentbl., 63, 1—55
- [5] Chapman, J. W. et al.; 1915, J. Econ. Entomol., 8, 140—150
- [6] Рыжова, И., Вирусы растений и насекомых × Вуслония × Латвия, 1983 (207), 39—440

VIRULENCE EVALUATION OF A NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS ISOLATED FROM *ORGYLE ANTIQUA* (L.)

He Li Zhang Luhong

(Northeast Agricultural College, Harbin)

Abstract

A strain of nuclear polyhedrosis virus (OaNPV) was isolated from a naturally dead larva of rusty tussock moth *Orgyle antiqua* (L.) in Harbin. Virulence of the OaNPV for 1st and 3rd instar larvae of the original host was evaluated by bioassay. Five virus dosages or concentrations were used in tests and data obtained from the two calculating methods were compared. The regression equations of mortality against dosage and concentration of 1st instar larva were $y_1 = 4.94 + 0.67x_1$ and $Y_1 = 3.58 + 0.67X_1$ respectively. The LD₅₀ value was 1.2 PIB/larva. The LC₅₀ value was 1.4×10^2 PIB/ml. The regression equations of mortality against dosage and concentration of 3rd instar larva were $y_3 = 3.80 + 0.49x_3$ and $Y_3 = 3.01 + 0.49X_3$ respectively. The LD₅₀ value was 2.6×10^2 PIB/larva. The LC₅₀ value was 1.1×10^4 PIB/ml. The LT₅₀ values of 1st instar larva for 1.026×10^2 , 1.026×10^4 and 1.026×10^6 PIB/ml treatments were 8.9, 5.7, and 4.5 days respectively. The LT₅₀ values of 3rd instar larva for 1.026×10^2 , 1.026×10^4 and 1.026×10^6 PIB/ml treatments were 9.4, 8.4 and 4.9 days respectively. Virulence of OaNPV to the original host was found to be rather high in the study. OaNPV may be considered as a potential agent for controlling the pest mentioned.

Key words Rusty tussock moth *Orgyle antiqua* (L.); OaNPV; Virulence evaluation