

体外组织培养增殖的油桐尺蠖 核型多角体病毒毒力 的生物测定

张忠信 彭辉银 金 锋
张英莲 王录明 曾云添

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

提 要

活体增殖和体外组织培养增殖的BsNPV悬液稀释成不同浓度, 分别喷于人工饲料上, 使其自然渗入饲料内, 接3龄幼虫取食感染, 感染剂量与幼虫死亡率的回归直线方程分别为: $y = 3.1815 + 0.679x$ 和 $y = 3.2000 + 0.665x$, 由回归直线方程推算的LD₅₀值及95%置信界限为 4.0753×10^2 $\left[\begin{matrix} 9.6075 \times 10^2 \\ 1.7301 \times 10^2 \end{matrix} \right]$ PIB/克饲料及 5.0898×10^2 $\left[\begin{matrix} 1.2411 \times 10^3 \\ 2.0874 \times 10^2 \end{matrix} \right]$ PIB/克饲料。感染剂量为 4×10^5 PIB/克饲料的LT₅₀值分别为4.7168天和4.8083天。比较两种来源的BsNPV, 其多角体的感染力无明显差异。

油桐尺蠖 (*Buzura suppressaria*) 幼虫血球细胞系和成虫卵巢细胞系已由谢天恩等成功地建立^[1, 2]。使用油桐尺蠖核型多角体病毒 (*Buzura suppressaria* Nuclear Polyhedrosis Virus 简称 BsNPV) 感染卵巢细胞系的细胞, 感染细胞的多角体含量可达 2×10^8 PIB/ml 培养液^[3]。关于体外组织培养增殖的苜蓿丫纹夜蛾核型多角体病毒 (*Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus) 的毒力测定, Vail, et al.^[4] 和 Ignoffo, et al.^[5] 已有报道。本文报道体外组织培养增殖的 BsNPV 毒力的生物测定, 并与虫体增殖的 BsNPV 进行比较。

材料和方法

供试幼虫:

本试验使用油桐尺蠖幼虫为人工饲料饲养的3龄幼虫, 孵化后15天。

本稿1986年2月21日收到

毒源:

(1) 组织培养增殖的病毒为利用卵巢细胞系细胞增殖的 BsNPV, 多角体含量为 5×10^7 PIB/ml。(2) 活体增殖的病毒是已配制成 BsNPV-82-HL 杀虫剂剂型的多角体, 其含量为 1×10^{10} PIB/ml。

病毒感染方法:

将两种来源的 BsNPV 分别稀释成 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 PIB/ml 五种浓度, 每瓶放入人工饲料约 30 克, 用微量电动喷雾器喷一定量的病毒悬液于饲料上, 使感染剂量为 4×10^5 、 4×10^4 、 4×10^3 、 4×10^2 、 4×10 PIB/克 饲料。待多角体悬液自然渗入饲料内, 每瓶接 3 龄幼虫 10 头, 分别在 28°C 、 22°C 两种温度下取食感染。感染后 3 天, 幼虫转入新鲜饲料, 逐日检查活虫数及病毒病死亡虫数, 感染后 11 天结束。

数据整理:

用常规数理统计方法求出各组的死亡率, 将百分死亡率换算成死亡率值, 求出 Log 感染剂量、Log 死亡天数与死亡率值的回归方程, 经卡方检验符合实际情况, 分别推算出 LD_{50} 、 LT_{50} 及其 95% 置信界限。

结果与讨论

一、两种温度对组织培养增殖的 BsNPV 感染力的影响:

1. 感染剂量与幼虫死亡率的关系:

在 28°C 、 22°C 两种温度下使用五种剂量 4×10^5 、 4×10^4 、 4×10^3 、 4×10^2 、 4×10 PIB/克 饲料感染 3 龄幼虫, 幼虫死亡率及死亡率值列于表 1, 表中数据为三项重复的平均值。

表 1. 体外组织培养增殖的 BsNPV 在两种温度下感染 3 龄幼虫的死亡率及死亡率值

Table 1. Larval mortality of *Buzura suppressaria* reared at different temperature from third-instar larvae treated with different dosage of a nuclear polyhedrosis virus propagated in vitro

温 度	28°C			22°C		
	感 染 剂 量 (PIB/克)	试虫头数	校正死亡率 (%)	机率值	试虫头数	校正死亡率 (%)
4×10^5	30	96.5	6.812	30	60.8	5.274
4×10^4	30	85.1	6.067	30	39.3	4.728
4×10^3	30	78.6	5.793	30	25.0	4.326
4×10^2	30	50.1	5.003	30	14.3	3.933
4×10	30	21.4	4.207	30	7.2	3.539

根据表 1 计算出病毒感染剂量对数与死亡率值的回归直线方程分别为:

$$y = 3.2000 + 0.665x$$

$$y = 2.4325 + 0.505x$$

其函数图象见图 1

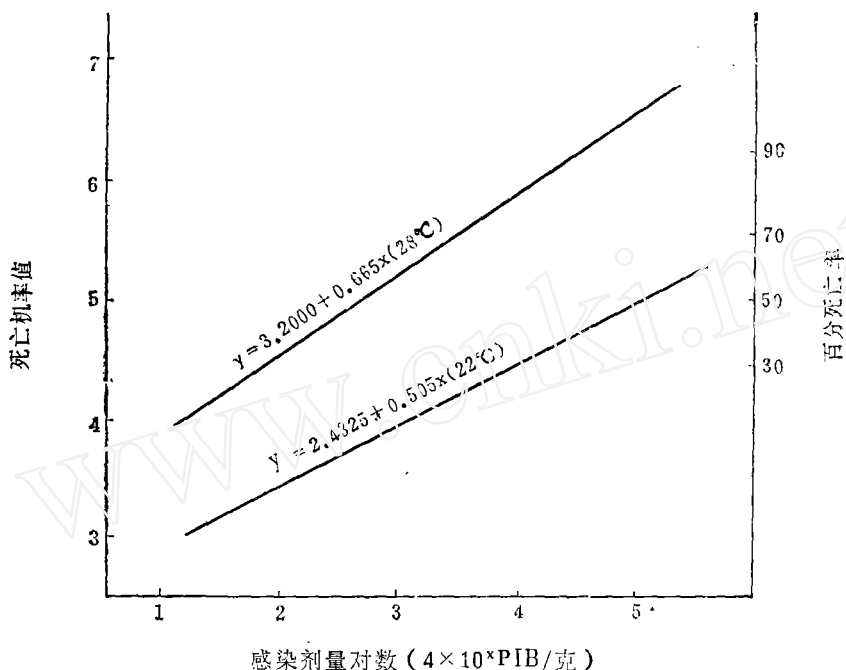


图1. 组织培养增殖的BsNPV在两种温度下感染剂量与死亡率的回归直线

Fig1. Regression of log dosage of a nuclear polyhedrosis virus propagated in vitro on percent mortality of *Buzura suppressaria* larvae reared at different temperature

根据回归直线方程推算出使3龄幼虫达到50%死亡率所需的感染剂量及其95%置信界限列于表2。

表2. 两种温度对组织培养增殖的BsNPV感染3龄幼虫的LD₅₀值的影响

Table 2. The effect of different temperature on LD₅₀ value for third-instar *Buzura suppressaria* larvae treated with a nuclear polyhedrosis virus propagated in vitro

温度	LD ₅₀ (PIB/克)	95%置信界限	
		上限	下限
28°C	5.0898×10^2	1.2411×10^3	2.0874×10^2
22°C	1.2123×10^5	4.8406×10^5	3.0401×10^4

2、幼虫死亡时间与死亡率的关系

在28°C、22°C两种温度下，使用 4×10^5 PIB/克饲料的剂量感染3龄幼虫，死亡天数的对数与死亡机率值的回归直线方程分别为：

$$y = 1.3561 + 5.343x$$

$$y = 3.375 + 1.813x$$

根据回归直线方程推算的LT₅₀值及其95%置信界限列于表3。

表 3. 两种温度对组织培养增殖的BsNPV感染3龄幼虫的LT₅₀值的影响

Table 3. The effect of different temperature on LT₅₀ value for third-instar Buzura suppressaria larvae treated with a nuclear polyhedrosis virus propagated in vitro

温 度	感染剂量 (PIB/克)	LT ₅₀ (天)	95% 置信界限	
			上 限	下 限
28°C	4×10 ⁵	4.8083	5.4930	4.2091
22°C	4×10 ⁵	8.2601	11.1037	6.1431

使用组织培养增殖的BsNPV在两种温度下感染油桐尺蠖3龄幼虫,高温条件下,病毒多角体的感染力增加,28°C与22°C条件下相比,LD₅₀值约相差200倍。在利用组织培养法提供毒源生产病毒杀虫剂的工艺中,选择合适的温度饲育油桐尺蠖幼虫,对提高病毒多角体的生产量有着重要意义。

二、不同来源的BsNPV毒力的比较

用活体增殖的BsNPV的五种剂量:4×10⁵、4×10⁴、4×10³、4×10²、4×10 PIB/克饲料,在温度为28°C的条件下感染油桐尺蠖3龄幼虫,其死亡率与死亡机率值列于表4。

表 4. 活体增殖的BsNPV感染3龄幼虫的死亡率及死亡机率值

Table 4. Larval mortality of Buzura suppressaria larvae treated with different dosage of a nuclear polyhedrosis virus propagated in vivo

感染剂量 (PIB/克)	试虫头数	校正死亡率 (%)	机率值
4×10 ⁵	30	96.4	6.799
4×10 ⁴	30	82.2	5.923
4×10 ³	30	67.8	5.462
4×10 ²	30	53.6	5.090
4×10	30	28.6	4.435

根据表4结果求出感染剂量的对数与死亡机率值的回归方程为:

$$y = 3.1815 + 0.697x.$$

其函数图象见图2。根据回归方程推算出使3龄幼虫达到50%死亡率所需的感染剂量。

根据幼虫死亡时间与死亡率的关系,求出死亡天数的对数与死亡机率值的回归直线方程为: $y = 0.5317 + 6.633x$, 根据回归方程推算出LT₅₀值,及其95%置信界限。不同来源的BsNPV的LD₅₀值,LT₅₀值及其95%置信界限列于表5进行比较。

表5的结果经生物统计学方法处理表明:体外组织培养增殖与活体增殖的BsNPV,其病毒多角体的活力没有明显差异。

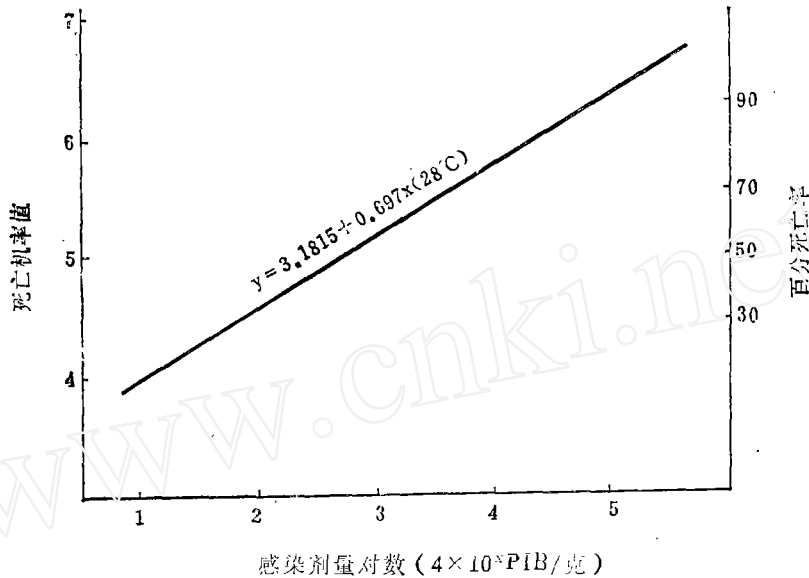


图2. 活体增殖的BsNPV感染3龄幼虫感染剂量与死亡率的回归直线

Fig 2. Regression of log dosage of a nuclear polyhedrosis virus propagated in vivo on percent mortality of *Buzura suppressaria* larvae

表5. 体外组织培养增殖与虫体增殖的BsNPV毒力的比较

Table 5. Laboratory comparison of activity of a nuclear polyhedrosis virus propagated in vivo and in vitro

病毒来源	LD ₅₀ 比较			LT ₅₀ 比较			
	LD ₅₀ (PIB/克)	95% 置信界限		感染剂量 (PIB/克)	LT ₅₀ (天)	95% 置信界限	
		上限	下限			上限	下限
组织培养增殖	5.0898 × 10 ²	1.2411 × 10 ³	2.0874 × 10 ²	4 × 10 ⁵	4.8083	5.4430	4.2091
虫体增殖	4.0753 × 10 ²	9.6075 × 10 ²	1.7301 × 10 ²	4 × 10 ⁵	4.7168	5.2092	4.2079

参 考 文 献

- [1] 谢天恩, 王录明, 兰萍章. 1984, 微生物学通报. 11(1): 2—3.
- [2] 刘松华, 谢天恩. 1986, 病毒学报. 1(4).
- [3] 王录明, 张英莲, 谢天恩. 1986, 病毒学杂志 1(4): 80—86.
- [4] Vail, P. V. et al., 1973, *J. Invertebr. Pathol.*, 22: 231—237.
- [5] Ignoffo, C. M. et al., 1974, *J. Invertebr. Pathol.*, 24: 184—187.

BIOASSAY OF A NUCLEAR POLYHEDROSIS
VIRUS OF THE TEA LOOPER,
BUZURA SUPPRESSARIA,
PROPAGATED IN CELLS
GROWN IN VITRO

Zhang Zhong-xin Pen Hui-yin Jin Feng
Zhang Ying-lian Wang Luo-ming Zheng Wen-tian

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

Bioassay of a Nuclear Polyhedrosis Virus propagated either in vivo or vitro was conducted on third-instar *Buzura suppressaria* larvae which were reared on an artificial diet contaminated with virus. The regression equation between dosage and mortality were:

$$Y = 3.1815 + 0.697X$$

$$Y = 3.2000 + 0.665X$$

The LD_{50} value and 95% fiducial limits were 4.0753×10^2 (9.0675×10^2)
 PIB/g of diet and 5.0898×10^2 (1.2411×10^3) PIB/g of diet, respectively.
(1.7361×10^2)
(2.0874×10^2)

The LT_{50} value for $4 \times 10^5 PIB/g$ of diet were 4.7168 days and 4.8085 days. No different in activity between the Nuclear Polyhedrosis Virus propagated in vitro and in vivo was detected.