

304-310

8425(11)

第7卷第3期
1992年9月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol.7 No.3
Sep. 1992油桐尺蠖核型多角体病毒杀虫剂
生产的新工艺谢天恩 彭辉银 曾云添 张忠信
王录明 张英莲 刘宇兰 金 锋 刘松华

(中国科学院武汉病毒研究所, 430071)

邓晚桂 ✓ 肖作铝

TQ453.5

(湖北省蒲圻羊楼洞茶场茶科所, 蒲圻437318)

提 要

本工艺的特点是以人工饲料饲养油桐尺蠖幼虫, 用昆虫细胞系增殖病毒作为毒源, 感染4龄幼虫, 收集病死虫, 提取多角体, 加工制成杀虫剂, 产品经安全性检测, 并进行田间试验, 有较好的杀虫效果。

关键词: 人工饲料养虫 细胞培养 病毒杀虫剂

油桐尺蠖, 核多角体病毒

1978年以来, 我们曾用天然饲料饲养油桐尺蠖幼虫增殖病毒, 经过加工制成多种病毒制剂, 田间试验证明, 防治油桐尺蠖有很好的效果^(1,2,3)。本研究在原有的工作基础上进一步改进, 采用昆虫细胞系增殖病毒作为毒源, 感染人工饲料饲养的四龄油桐尺蠖幼虫, 在室温28—30℃、湿度70—85%, 饲养7~9天, 收集病死虫, 加工制成病毒杀虫剂的新工艺。

材 料 与 方 法

一、养虫室的设置

养虫室分成虫饲养室、人工饲料配制室、幼虫饲养室、病毒感染室及产品加工室。养虫室及感染室的用具、器皿等均经过严格的消毒处理后使用。

二、成虫管理

成虫产卵笼, 其大小为 $\phi 200 \times h 300$ mm。每个产卵笼中放入雌蛾10头, 雄蛾7—10头, 底层

本文于1991年10月4日收到, 1992年2月15日修回。

垫二层湿纱布，上端盖二层湿纱布供成虫产卵，并注意保持纱布的湿度，在温度25—26℃、相对湿度90%，成虫交配后24小时便开始产卵，单个雌蛾产卵量为1600—3810粒，产卵期为7—10天。

三、人工饲料的配制^[1]

| | |
|----------------------------------|--------|
| 茶 叶 粉 | 140 克 |
| 黄 豆 粉 | 30 克 |
| 酵 母 粉 | 15 克 |
| 蔗 糖 | 12.5克 |
| 山 梨 酸 | 0.8克 |
| 尼泊金乙酯 | 1.2克 |
| 复合V _c 、V _b | 各40片 |
| 琼 脂 | 20 克 |
| 水 | 800 升毫 |

称取20克琼脂放入1000毫升搪瓷量杯中，加入800毫升水，置高压消毒锅内15磅灭菌15分钟，待压力指针降至零时，取出琼脂用搅拌机搅拌，依次缓缓加入山梨酸、尼泊金乙酯、蔗糖、酵母粉、复合维生素B、C、黄豆粉、茶叶粉等，边加边搅拌，待全部混匀后倒入灭菌的盘内，先置室温冷却，凝固后放入冰箱备用。

四、卵料管理

1. 卵块分装 待孵化的卵块变黑时（约6—7天）取出，在75%乙醇中浸泡1—2分钟，再浸入4%的福尔马林溶液中10分钟，用无菌水洗涤两次，放在灭菌的滤纸上吸干水份（约30分钟）然后将消毒的卵块每50粒装入一个由25×20mm²滤纸折叠成的小盒中。

2. 饲料分装与接卵 将配制好的人工饲料从冰箱中取出，切成25×30×15mm³大小的方块，每块重约12g。每个罐头瓶装2块。然后将装好的卵用镊子放入罐头瓶内，用灭菌的黑布盖住瓶口，并用橡皮筋捆好上架。

3. 幼虫饲养 接卵约一天后，幼虫即孵化出来。因幼虫趋光性强，必须用黑布或深色布复盖，待幼虫到二龄末期时揭去黑布。其间经约19—22天。当大部分幼虫达四龄末期时，选留一部分继续饲养传代，另一部分送入感染室。

五、毒源制备

1. 将提纯的多角体（浓度为 2×10^7 PIB/ml）以添食方式饲喂4—5龄幼虫，4—5天后镜检气管皮膜细胞和血球细胞，当细胞核中出现多角体时，将罹病幼虫用70%乙醇溶液进行体表消毒，剪尾足，收集病虫血淋巴；加入含有饱和苯基硫脲的Grace培养液，稀释10倍于3000r/m离心沉淀30分钟；取上层液用0.45毫微米孔径的过滤膜过滤，得滤液即为病毒悬液；将病毒悬液储存冰箱备用。

2. 油桐尺蠖血球细胞系和卵巢细胞系分别在26℃下培养三天，用血球计数板进行细胞计数，使细胞浓度为 4×10^8 个/ml。

3. 将病毒悬液接种于细胞后，在26℃吸附1—3小时，然后在26℃下静置培养15—20天，待观察到细胞内有大量多角体出现时，收集细胞悬液在冰浴下用Je-3型超声破碎器处理2—3分钟，使多角体从细胞内全部释放出来，其含量可达 5×10^7 PIB/ml，按100单位/ml加双抗，置冰箱备用。

结 果

一、健康幼虫的饲养

用人工饲料大批量地饲养油桐尺蠖的主要器皿为 $10 \times 8 \times 8 \text{ cm}^3$ 的罐头瓶，每瓶内置 50—80 粒卵，每批可投放 $5-10 \times 10^4$ 粒卵，共计 1500 至 2000 瓶。人工饲料饲养的幼虫约经 30—35 天即可进入蛹期，再经 25 天左右即可羽化产卵，成虫期为 4—7 天，最长可达 10 天。产卵期为 7—10 天，卵的孵化率平均可达 96% 以上。从卵孵化为幼虫至 4 龄期约为 18—22 天，其成活率平均为 48.8%。

二、添食感染幼虫

将人工饲料饲养到四龄的油桐尺蠖幼虫按 10 头/瓶分装，更换新鲜饲料，然后用微量电动喷雾器将组织培养提供的毒源按 $1 \times 10^7 \text{ PIB/ml}$ /瓶喷到饲料表面，添食四龄幼虫，置室温 28°C ，相对湿度 85% 饲养，其幼虫的死亡率 8 天为 83.3—96.7%。

三、收集病死虫

油桐尺蠖幼虫感染 5 天后开始将典型病毒病死亡的幼虫逐一收集于瓶内，并放入冰箱保存，没有死亡的幼虫更换新鲜饲料后继续饲养，将收集的病死虫按不同龄期分别测定多角体的数量，结果见表 1。

表 1. 收集不同龄期幼虫的多角体数量比较

Table 1. The comparison of number of BsNPV propagation in different age of larvae

| 幼虫龄期 Larval instar | 被测虫数 Number of larvae | 多角体含量/头 PIBs/larva | | 平均(亿/头) Average (PIBs/larva) |
|-----------------------|--------------------------|-----------------------|--------------|------------------------------------|
| | | 最高 Highest | 最低 Lowest | |
| | | 3 | 10 | |
| 4 | 10 | 39.0 | 19.8 | 27.0 |
| 5 | 10 | 113.8 | 63.5 | 83.9 |
| 6 | 10 | 263.1 | 205.1 | 230.1 |

表 1 结果表明，高龄幼虫增殖的多角体含量显著高于低龄幼虫获得的多角体数量，低龄幼虫虽然对 BsNPV 敏感，但从单虫收获多角体数量上看，比 5—6 龄幼虫要少 3—10 倍，因此，确定四龄幼虫用于感染，感染后 5—7 天，该时期恰为幼虫增加一个龄期，这样对病毒的产量提高是十分有利的。

四、BsNPV 杀虫剂的配制与检测

(一) 多角体的提纯 将收集的病死虫尸加 2—3 倍无菌水稀释，经高速组织匀浆器作间断匀浆 2—3 分钟后取出，用三层纱布过滤，滤液加 8—10 倍的蒸馏水再稀释，采用差异离心法经 3—5 轮次，即可获得比较纯净的多角体。

(二) 多角体的计数^[6] 将提纯的多角体按常规血球计数方法计数，使多角体含量达 200 亿 PIB/g，低于此标准时需重新浓缩提取。

(三) 剂型的配制与分装 经血球计数器计数的多角体按照预先选定的各种辅助

剂配制成 100 亿 PIB/ml 病毒乳剂 (即 BsNPV-HL)。

(四) 产品毒力测定 对油桐尺蠖病毒制剂 (简称 BsNPV-HL) 随机抽样进行产品活性测定^[7]。选择不同稀释浓度的 BsNPV 添食 2—3 龄油桐尺蠖幼虫, 每组 30 头, 重复三次, 与虫体增殖的病毒作为毒源生产的制剂进行比较。在室温 24—26℃ 相对湿度为 80% 的条件下, 统计分析第 10 天的结果, 详见表 2。

表 2. 两种病毒制剂的毒力比较

Table 2. Comparison of activities of two viral preparations from cell culture and virus-infected *B. suppressaria* larvae

| 供试种类 Testing species | 回归方程 Regression equation | LT50 | LD50 | 置信限 95% Fiducial limits | |
|-------------------------|-----------------------------|------|--------------------|----------------------------|--------------------|
| | | | | 上限 Upper limit | 下限 Lower limit |
| 组织培养 V.t | $Y=3.2+0.67x$ | 4.81 | 5.09×10^3 | 1.24×10^3 | 2.09×10^3 |
| 虫体 V.a | $Y=3.18+0.70x$ | 4.71 | 5.08×10^3 | 9.61×10^2 | 1.73×10^3 |

表 2 结果说明, 组织培养提供的毒源生产的病毒杀虫剂 (V.t) 与虫体增殖的病毒生产的病毒杀虫剂 (V.a) 的毒力差异不明显。

(五) 产品的安全性检测^[8] 油桐尺蠖病毒制剂 (BsNPV-85-HL) 经武汉市卫生防疫站检测, 其结果与美国生产的棉铃虫核型多角体病毒杀虫剂 (Biotrol VHZ) 和午毒蛾核型多角体病毒杀虫剂 (Gypchek) 进行比较, 结果见表 3。

表 3. 三种病毒制剂安全性检测结果比较

Table 3. Comparison of safety test for three viral pesticides

| 检测项目 Testing item | 结果比较 Comparison of results | | |
|--|-------------------------------|----------------------|----------------------|
| | BsNPV-85-HL | Biotrol-VHZ | Gypchek |
| 杂菌总数 Total contaminant levels of microorganism | $4 \times 10^6/\text{ml}$ | $1 > 10^7/\text{ml}$ | $1 < 10^9/\text{ml}$ |
| 沙门氏菌 Salmonella | — | — | — |
| 志贺氏菌 Shigella | — | — | — |
| 大肠杆菌 Colan bacillus | — | — | — |
| 弧菌 Vibrio'nes | — | — | — |
| 金色葡萄球菌 Staphylococcus aureus | — | — | — |
| 耶尔森氏菌 Yersinia's | — | — | — |

结果表明,对本工艺生产出来的病毒制剂进行抽样检查,均未发现任何致病菌。在BsNPV-85-HL制剂中,其杂菌含量低于美洲棉铃虫核型多角体病毒杀虫剂和午毒蛾核型多角体病毒杀虫剂的指标。

(六)油桐尺蠖病毒杀虫剂与化学农药田间药效的比较 田间小区试验分为四个处理区,即组织培养提供的毒源生产的病毒制剂(V.t);与虫体增殖的毒源生产的病毒制剂(V.a);化学农药采用敌杀死和敌敌畏。重复四次,每个小区试验面积为0.58亩,用水量为120斤/亩,施药前调查虫口基数,施药后按不同时间调查残存活虫数,计算虫口下降率,结果见表4。

表4. 油桐尺蠖病毒制剂与化学农药的药效比较

Table 4. The comparison of mortality for the viral insecticides and the chemical pesticides to *B. suppressaria* in the tea field

| 供试种类 Testing species | 试验面积 Testing area | 重复次数 Repeat time | 虫口基数 Basic larvae | 防治效果(%) Percent of mortality | | | |
|----------------------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------------------|------|---------|------|
| | | | | 7 days | | 10 days | |
| | | | | Remnant | Mort | Remnant | Mort |
| 组织培养 V.t | 0.58 | 4 | 686 | 125 | 81.8 | 32 | 95.4 |
| 虫体 V.a | 0.58 | 4 | 678 | 82 | 87.9 | 16 | 97.6 |
| 敌杀死 Decis | 0.58 | 4 | 688 | 0 | 100 | 0 | 100 |
| 敌敌畏 DDVP | 0.58 | 4 | 767 | 220 | 71.3 | 185 | 76.0 |

结果表明,油桐尺蠖病毒制剂的防治效果均优于常规化学农药(DDVP),略低于高效化学杀虫剂(Decis),与其它试验结果一致^(2,4)。

讨 论

一、该生产工艺具备以下几个特点:(1)利用人工饲料饲养油桐尺蠖幼虫,便于工厂化生产,产品标准化,保证产品质量,同时改变了以天然饲料养虫受自然气候及虫情变化的影响。(2)利用组织培养增殖病毒提供毒源的技术,可以有效地保证多角体的纯度和安全性。

二、幼虫感染期的选择与病毒的增殖量有密切关系,该工艺选择四龄末、五龄初幼虫感染是十分合理的。

三、该工艺采用一步接卵法有利于初孵幼虫的生长,同时减少了杂菌污染的机会。过去从投卵到感染需要换饲料2—3次,现在能达到从投放卵到四龄感染只需更换一次饲料,节省了大量的人力,成本也可大大降低。

四、由于油桐尺蠖初孵幼虫在初期很少取食,而且有很强的趋光性,在人工饲养过程中尤其1龄幼虫逃逸率高,直接影响了幼虫的成活率,有待于进一步改进。

五、该生产工艺为大规模工厂化生产油桐尺蠖核型多角体病毒杀虫剂提供了可靠的依据，在国内尚未见报道（见图1）。

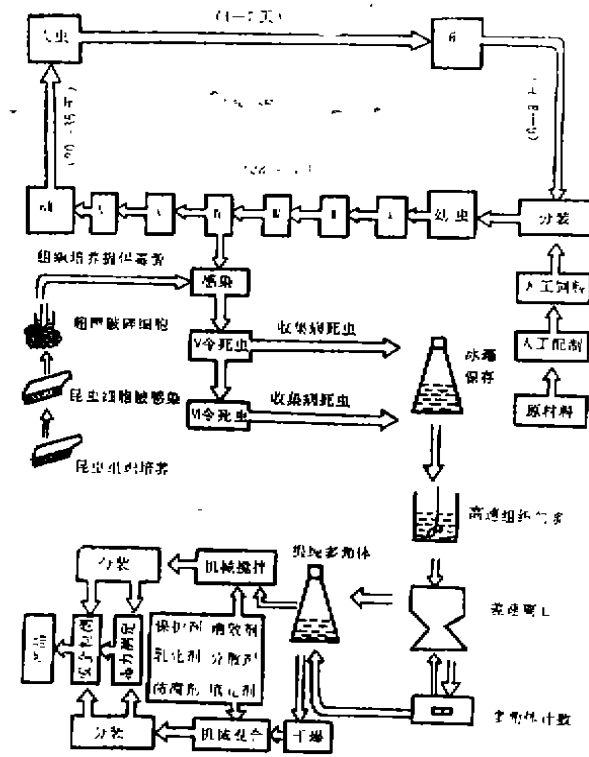


图1 B_sNPV-85-HL 生产工艺示意图

Fig. 1 Diagrammatic representation of technique production of *B. suppressaria* NPV pesticide (B_sNPV-85-HL)

参 考 文 献

[1] 谢天恩等, 1980, 中国茶叶, 5: 18—20。
 [2] 彭辉银等, 1983, 茶叶通讯, 4: 51—52。
 [3] 彭辉银等, 1988, 生物防治通讯, 4: 186—187。
 [4] 刘宇兰等, 油桐尺蠖人工饲料的初步研究(待发表)。
 [5] 北京大学微生物教学小组编, 1964, 微生物实验指导, 人民教育出版社, 第55—56页。
 [6] 佐藤威, 1981, 植物防疫, 35(5): 233—237。
 [7] Ignoffo C. M., 1965, *J. Invertebr. Pathol.*, 7: 315—319。
 [8] Shapiro M. and Ignoffo C. M., 1970, *J. Invertebr. Pathol.*, 16: 107—117。
 [9] Shapiro M., 1982, in *Microbial and Viral Pesticides*, Kusstark E. (Ed.) Marcel Dekker, Inc, New York and Basel, pp463—492。

New Technique for the Production of Viral Insecticide of *B. suppressaria* Nuclear Polyhedrosis Virus

Xie Tian-en Peng Hui-yin Zhen Yun-tian Zhang Zhong-xin
Wang Lu-ming Zhang Yin-liang Liu Yu-lan Jin Feng Liu Song-hua

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430 071)

Den Wuan-gui Xiao Zuo-lu

(Pu-qi Institute of Tea Sciences in the Farm, Puqi county, Hubei)

The oil tree moth (*B. suppressaria* larvae) was grown to 4 instar using a semi-synthetic artificial diet, then infected with (BsNPV) inoculum propagated in the insect cell cultures. 7 days p.i., the virus-infected larvae were collected and virus (PIB) was purified by differential centrifugation. Then, a flowable formulation was made with the glycerin, virus-protective agent, emulsion and antibiotic preparation was determined by standard bioassays using laboratory-reared larvae on artificial diet. LC50 was 2.36×10^8 PIB/ml. The safety test was done and the field trial was fully effective.

Key words, Artificial diet for insect Cell culture Viral insecticide