

温度对美国白蛾核型多角体病毒活性的影响

殷 灿¹,刘 笛¹,任 骥¹,卢希平^{1,2},乔鲁芹^{1,2*}

1. 山东农业大学植物保护学院, 山东 泰安 271018
2. 山东省林业有害生物防控工程技术研究中心, 山东 泰安 271018

摘要: 本文研究了不同温度、不同处理时间对美国白蛾核型多角体病毒(*Hyphantria cunea* nuclear polyhedrosis virus, HcNPV)水剂和干粉活性的影响, 研究表明: 随着温度升高和持续时间增长, HcNPV活性降低, LT₅₀变长; 病毒干粉比病毒水剂对温度的耐受性强, 但其LT₅₀会显著延长。55℃水浴处理HcNPV水剂60 min, 其活性仍有67%。在水浴100℃条件下处理15 min, 其致病率仅有17.41%, 病毒干粉在烘箱120℃条件下处理15 min, 致病率为47.91%。

关键词: 美国白蛾; 核型多角体; 病毒活性; 温度; LT₅₀

中图分类号: S476+.13

文献标识码: A

文章编号: 1000-2324(2015)03-0353-04

Effect of Temperature on Activity of *Hyphantria cunea* Nuclear Polyhedrosis Virus (HcNPV)

YIN Can¹, LIU Di¹, REN Ji¹, LU Xi-ping^{1,2}, QIAO Lu-qin^{1,2*}

1. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

2. Engineering Research Center of Forest Pest Management of Shandong Province, Tai'an 271018, China

Abstract: We studied on temperature influencing the activity of *Hyphantria cunea* nuclear polyhedrosis virus (HcNPV) and the results showed that with the temperature and treated-time increasing, the activity of HcNPV reduced, and LT₅₀ elongated. The activity of HcNPV suspension was affected more than the HcNPV powder by temperature, while the LT₅₀ of HcNPV powder lengthened significantly. The activity of HcNPV suspension treated by bath at 55℃ for 60 min was 67%. The activity of HcNPV suspension treated by water bath at 100℃ for 15 min was only 67%, but the activity of HcNPV powder treated by oven at 120℃ for 15 min was still 47.91%.

Keywords: *Hyphantria cunea*; nuclear polyhedrosis virus (NPV); activity; temperature; LT₅₀

美国白蛾 *Hyphantria cunea* (Drury) (又名美国灯蛾、秋幕毛虫) 是世界性检疫害虫。自 1979 年传入我国辽宁丹东以来, 对我国的园林树木、经济林、农田防护林等造成了十分严重的危害。近年来, 各地多采用包括人工防治、物理防治、化学防治和生物防治在内的多种措施进行综合治理, 其中利用美国白蛾核型多角体病毒(*Hyphantria cunea* nuclear polyhedrosis virus, HcNPV)防治美国白蛾低龄幼虫具有良好效果。

温度是影响病毒活性的主要因子, 不同的病毒制剂对极端温度的耐受性不同。小菜蛾颗粒体病毒(*Plutella xylostella* Granulosis Virus, PxGV)经 80℃高温处理 10 min, 活性迅速降低^[1]; 在 50~60℃条件下处理 30 min, 病毒失活; 100℃时几秒钟即能丧失活性^[2]。将重组杆状病毒 AcMNPV-BmKIT-Chi 沸煮 10 min 毒力明显下降^[3]。茶尺蠖核型多角体病毒 (*Ectopis obliqua* nuclear polyhedrosis virus, EoNPV) 水悬液经 80℃(水浴)或干多角体经 120℃(烘箱)处理 15 min 多角体后, 均失去活性^[4]。大蜡螟核型多角体病毒 (*Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis virus, GmMPV) 在 60℃条件下处理 40 min 或者 50℃条件下处理 60 min 均可完全灭活^[5]。棉铃虫核型多角体病毒 (*Heliothis* spp. nuclear polyhedrosis virus, HsNPV) 在 75℃到 80℃条件下处理 10 min 即可失活, 粉纹夜蛾核型多角体病毒 (*Trichoplusia ni*. nuclear polyhedrosis virus, TnNPV) 需要在 82℃到 88℃条件下处理 10 min 才可灭活^[6]。茶尺蠖核型多角体病毒悬液经 80℃(水浴)或干多角体经 120℃(烘箱)处理 15 min 多角体可失去活性^[4]。

美国白蛾核型多角体病毒是防治美国白蛾的重要生物因子, 已有许多学者在其形态学、生物学、毒性、安全性等方面做过研究^[7-10]。近年来, 刘玉书、郑桂玲等研究了该病毒的大量增殖技术^[11,12]; 段彦丽等对其传播途径进行了研究^[13]; 杨唯一、刘海明等在病毒的增效方面进行了探索^[14,15]。然而, 关于美国白蛾核型多角体病毒稳定性方面的研究鲜见报道。本研究借鉴前人的研究方法和技术, 在

收稿日期: 2013-10-12

修回日期: 2013-10-26

基金项目: 科技部“十二五”科技支撑计划项目“食品安全生产关键技术集成与示范”(2012BAK17B 05)

作者简介: 殷 灿(1989-),女,河北邢台人,在读硕士研究生.研究方向:林木昆虫. E-mail:yincan129@163.com

***通讯作者:** Author for correspondence. E-mail:lqiao@sdau.edu.cn

温度对美国白蛾核型多角体病毒活性的影响方面进行了研究,旨在为深入探索该病毒的流行机理以及病毒制剂的研发应用提供理论依据。

1 材料方法

1.1 病毒与试虫

病毒:由室内人工饲养的美国白蛾幼虫复制获得。用差速离心法分离提纯,双蒸水悬浮制成水剂,显微计数后,置于 4℃ 冰箱内保存。

试虫:室内用人工饲料连续饲养 10 代以上的美国白蛾幼虫,饲养条件为温度 25℃、湿度 75%、光周期 L:D=14:10。

1.2 病毒多角体水剂水浴处理

将病毒水剂分装于 10 mL 离心管中,水浴加热并测量温度。加热处理分成两组:一组设置 30℃、40℃、60℃、80℃、100℃ 共 5 个梯度,待加热到相应温度时,维持 15 min 后取出自然冷却;另一组设置 0 min、30 min、60 min、90 min、120 min、150 min 6 个梯度,待加热温度达到 55℃ 时,保持恒温,并在相应时间取出病毒悬液自然冷却。所有处理过的病毒均放置于 4℃ 冰箱保存备用。

1.3 病毒多角体干粉烘箱处理

取病毒水悬液 0.3 mL 滴入 Ø6 cm 培养皿中摊平呈薄层,自然晾干。设 40℃、60℃、80℃、100℃、120℃ 5 个梯度。调节烘箱至相应的温度,待温度稳定后,放入盛有病毒的培养皿,保持恒温 15 min。取出后自然冷却至室温,用 0.3 mL 蒸馏水分数次洗出病毒多角体。置于 4℃ 冰箱保存备用。

1.4 生物测定

稀释病毒悬浮液浓度为 8.8×10^5 PIB/mL,取病毒水悬液接到人工饲料上(每杯饲料接入 150 μL 病毒液),自然晾干。于杯中接入健康的美国白蛾 3 龄幼虫,每处理接幼虫 30 头,重复 3 次,各试验均设置蒸馏水为空白对照。观察幼虫每日死亡数,计算累计死亡率、矫正死亡率。

1.5 数据统计分析

使用 spss16.0 软件对 HcNPV 的生测数据进行回归分析和方差分析(LSD 法)。

2 结果与分析

2.1 55℃ 水浴处理 HcNPV 水剂对其活性的影响

HcNPV 水剂经水浴 55℃ 处理不同时间,对其活性的影响结果(见图 1 和表 1)。

从图 1 可以看出,处理病毒的时间对病毒感染幼虫的死亡率有显著影响。从处理 0 min 的对照组到处理 150 min 的各处理组,感病幼虫死亡率从 84.45% 到 38.49% 显著降低。但是,处理 90 min, HcNPV 活性仍能达到 53%。

从表 1 看,随着处理时间的延长, HcNPV 对宿主的致死中时间(LT₅₀)从 12.18~15.81 d 逐渐延长,且各处理间差异显著,其回归方程为 $y=0.02x+12.43$ ($P<0.01$)。

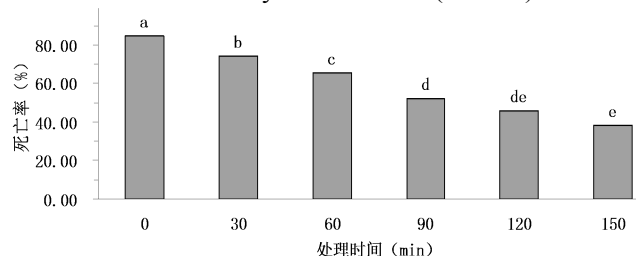


图 1 55℃ 水浴处理的 HcNPV 水剂感染美国白蛾幼虫的死亡率

Fig.1 The mortality rate of *Hyphantria cunea* larva infected by HcNPV suspension treated by water bath at 55℃

值得指出的是,尽管在 55℃ 水浴下处理 HcNPV 水剂 30 min 和 60 min,其感染美国白蛾幼虫的死亡率和 LT₅₀ 较对照组的分别显著的降低和显著的增长。但是处理 30 min, HcNPV 感染宿主的死亡率仍有 70% 以上;处理 60 min 的,也仍保有 65% 左右。并且它们的 LT₅₀ 仅比对照组的晚 1 d。另外,尽管本研究中处理 0 min 的对照也是经历了从室温加热到 55℃ 的处理过程,但是其活性却依然有

85%以上,与未处理的 HcNPV 间无显著性差异。

表 1 55 °C 水浴处理的 HcNPV 水悬液感染美国白蛾幼虫的 LT₅₀
Table 1 The LT₅₀ of *Hyphantria cunea* larva infected by HcNPV suspension treated by bath at 55 °C

处理时间(min) Treated time(min)	LT ₅₀ (d)	95%置信区间 95% Confidence limits		斜率(±SE) Slope(±SE)	P 值 Significant
		低 Lower bound	高 Upper bound		
CK	12.18	11.69	12.73	0.22±0.012	0.015
30	13.22	12.76	13.75	0.23±0.014	0.329
60	13.97	13.28	14.83	0.22±0.014	0.005
90	14.91	14.16	15.89	0.20±0.015	0.048
120	15.24	14.43	16.32	0.21±0.016	0.033
150	15.81	14.91	17.04	0.20±0.016	0.044

2.2 温度对不同剂型病毒的影响

温度对病毒活性的影响与病毒的存在状态有关,病毒水剂较病毒干粉受温度影响更加明显。由图 2 可见,水浴 30 °C 处理病毒水剂 15 min 和烘箱 40 °C 处理病毒干粉 15 min,幼虫死亡率很高,且无显著性差异,说明 HcNPV 在此处理下仍有较高活性。随着温度的升高,HcNPV 的活性逐渐降低,水浴 100 °C 处理 HcNPV 水剂 15 min,病毒基本失活。分别比较温度 40 °C、60 °C、80 °C 和 100 °C 处理的不同状态的病毒,可以看到经相同温度处理,病毒干粉感染美国白蛾幼虫的死亡率都显著高于病毒水剂。HcNPV 水剂各处理间感病幼虫死亡率存在显著差异,而病毒干粉经 40 °C 和 60 °C 处理后,感病幼虫死亡率无显著差异;经 100 °C 处理的病毒干粉与经 80 °C 处理病毒干粉相比较,其感病幼虫死亡率未显著降低,而与经 120 °C 处理的病毒干粉的活性相比较,其感病幼虫死亡率也未表现显著差异。

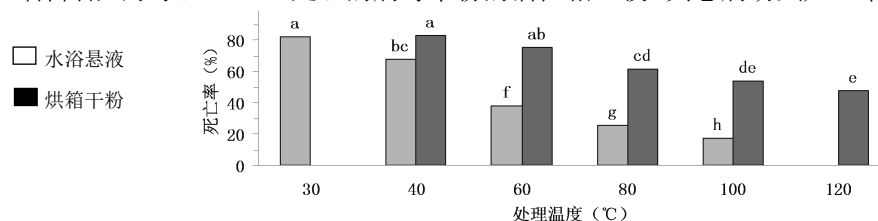


图 2 不同温度处理 HcNPV 15 min 感染美国白蛾幼虫的死亡率

Fig.2 The mortality rate of *Hyphantria cunea* larva infected by HcNPV treated at different temperature for 15 min

病毒水剂和病毒干粉感染宿主的 LT₅₀ 值均随着处理温度的升高而显著提高,其回归方程分别为:病毒水剂 $y=0.05x+13.10$ ($P<0.05$); 病毒干粉 $y=0.03x+11.60$ ($P<0.01$)。结合图 2 和表 2、3 可以看出,水浴 30 °C 处理病毒水剂 15 min 与烘箱 40 °C、60 °C 处理病毒干粉 15 min 后,感染宿主的死亡率无显著性差异,但后者较前者的 LT₅₀ 却显著地延长了将近 2 d。同样的结果也出现在经水浴 40 °C 处理病毒水剂和经烘箱 80 °C 处理病毒干粉的比较上。

表 2 不同温度处理 HcNPV 水悬液病毒 15 min 感染美国白蛾幼虫的 LT₅₀

Table 2 The LT₅₀ of *Hyphantria cunea* larva infected by HcNPV suspension treated at different temperature for 15 min

处理温度(°C) Treated temperature(°C)	LT ₅₀	95%置信区间 95% Confidence limits		斜率(±SE) Slope(±SE)	P 值 Significant
		低 Lower bound	高 Upper bound		
30	11.08	10.66	11.54	0.25±0.013	0.029
40	13.31	12.81	13.89	0.21±0.013	0.443
60	17.35	16.26	18.85	0.17±0.015	0.979
80	20.28	18.46	23.12	0.15±0.017	1.000
100	23.47	20.53	29.09	0.15±0.024	0.999

表 3 不同温度处理 HcNPV 干粉病毒 15 min 感染美国白蛾幼虫的 LT₅₀

Table 3 The LT₅₀ of *Hyphantria cunea* larva infected by HcNPV powder treated at different temperature for 15 min

处理温度 Treated temperature(°C)	LT ₅₀	95%置信区间 95% Confidence limits		斜率(±SE) Slope(±SE)	P 值 Significant
		低 Lower bound	高 Upper bound		
40	12.76	11.81	13.98	0.22±0.021	0.067
60	13.10	12.33	14.09	0.22±0.023	0.537
80	14.12	13.22	15.37	0.21±0.025	0.182
100	14.77	13.26	17.77	0.22±0.028	0.003
120	15.23	13.84	17.82	0.22±0.030	0.056

3 讨论与结论

温度对病毒活性的影响主要表现在其宿主感染后的死亡率和死亡时间的变化(LT₅₀)。随着温度的升高和处理时间的延长,病毒活性降低,表现在感病幼虫死亡率降低和致死中时间增加。分别用水浴和干热 100 °C 高温处理 HcNPV 水剂和干粉 15 min,其感病宿主的死亡率分别为 17.41% 和 53.91%。表明多角体水剂比多角体干粉更容易受温度影响而失活,这与殷坤山等对茶尺蠖核型多角体病毒研究的结论一致^[4]。从温度对不同状态病的活性影响的结果可以看出,同样的温度和处理时间,HcNPV 干粉在致病性与 HcNPV 水剂无显著差异的情况下,致死中时间却明显延长,这与 Morris 对橡木尺蠖核型多角体病毒(*Lambdina fiscellaria lugubrosa* nuclear polyhedrosis virus, LfNPV)的研究结论一致。橡木尺蠖核型多角体病毒在 45 °C 下处理 120 h,其感染宿主死亡的 LT₅₀ 增长,但宿主最终死亡率无显著差异^[16]。经水浴 55 °C、150 min 处理的 HcNPV 水剂和经水浴 100 °C、15 min 处理的 HcNPV 水剂仍有一定活性,说明 HcNPV 水剂对短时的高温(80 °C 以上)和一定时间的亚高温(40~60 °C)有一定的耐受性。

作为昆虫病原微生物,昆虫病毒在昆虫疾病流行中起着十分重要的作用。因其具有对宿主专一性强,对环境友好等特性日益为人们所重视,应用前景十分广阔。但作为生物制剂,昆虫病毒也存在一定的局限性,比如微生物制剂的稳定性较差、野外施用方法不够规范等问题^[17]。笔者建议,在美国白蛾核型多角体病毒制剂的加工和野外施用过程中,应注意以下几个问题:(1)在制剂加工过程中注意避免高温环境。粉剂可忍受 15 min 内 60 °C 以下的高温环境,但最好不要超过 40 °C;水剂等溶液状态的剂型尽量避免 30 °C 以上的高温;(2)在低温环境下保存病毒;(3)在使用时除注意应在低龄幼虫期施用外,更应注意避免在高温烈日下施用,夏季时可在清晨或傍晚进行施药。

环境中的各种生态因子,对昆虫病毒的稳定性有明显影响,因此,关于昆虫病毒稳定性的研究是病毒生态学研究中的重要内容^[18-21]。本文仅从环境温度的角度对美国白蛾核型多角体病毒的稳定性进行了研究,以期对昆虫病毒流行病学研究以及利用病毒制剂进行害虫的持续控制提供依据。

参考文献

- [1] 朱树勋,吴青.小菜蛾颗粒体病毒研究初报[J].微生物学通报,1980(3):99-101
- [2] 冯振群,程清泉,秦启联.小菜蛾颗粒体病毒杀虫剂研究与应用进展[J].现代农业科技,2009(18):144-146
- [3] 柴宝峰,王伟,梁爱华,等.温度和 pH 值对重组杆状病毒(AcMNPV-BmK IT-Chi)的毒力影响[J].应用与环境生物学报,2007,13(3):338-340
- [4] 殷坤山,肖强,唐美君,等.温度、光、pH 值对茶尺蠖病毒活性的影响[J].茶叶,2004(2):85-87
- [5] Gordon R S, Sheila E. Milligan. Effects of Heat on Nonoccluded Nuclear Polyhedrosis Virus (Baculovirus) from *Galleria mellonella* Larvae[J]. Environmental Entomology, 1979,8(4):756-759
- [6] Gudauskas R T, And D. The effect of heat, buffer salt and H-ion concentration, and ultraviolet light on the infectivity of *Heliothis* and *Trichoplusia* nuclear-polyhedrosis viruses[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1968,12(3):405-411
- [7] 艾德洪,于启文,李玉璠,等.美国白蛾核型多角体病毒的形态结构和感染力测定[J].辽宁农业科学,1982(6):34-37
- [8] 于性跃,任立新,艾德洪,等.美国白蛾核型多角体病毒对几种脊椎动物的安全性试验[J].辽宁农业科学,1983(4):49-51
- [9] 艾德洪,于启文,李玉璠,等.美国白蛾核型多角体病毒的应用研究[J].植物保护学报,1984(2):127-132
- [10] 燕长安.用美国白蛾核型多角体病毒防治美国白蛾[J].新农业,1986(14):21-27
- [11] 刘玉书,祁振坤,曹占明,等.美国白蛾核型多角体病毒增殖方法[J].天津农林科技,2010(4):4-5
- [12] 郑桂玲,周洪旭,耿以龙,等.美国白蛾核型多角体病毒室内大量增殖的研究[J].中国森林病虫,2011(5):36-38
- [13] 段彦丽,曲良建,王玉珠,等.美国白蛾核型多角体病毒传播途径及对寄主的持续作用[J].林业科学,2009(6):83-86
- [14] 刘海明,周洪旭,李长友.荧光增白剂与增效蛋白对美国白蛾核型多角体病毒(HcNPV)的增效作用[J].农药学报,2013(2):153-158
- [15] 杨唯一,张永安,唐明,等.三种荧光增白剂对 HcNPV 增效作用研究[J].林业科学研究,2009(5):736-739
- [16] Morris O N. The effect of sunlight, ultraviolet and gamma radiations, and temperature on the infectivity of a nuclear polyhedrosis virus[J]. J Invertebr Pathol, 1971,18(2):292-294
- [17] Erlandson M. Insect Pest Control by Viruses[M]. Oxford: Academic Press, 2008
- [18] 吕鸿声.昆虫病毒与昆虫病毒病[M].北京:科学出版社,1982
- [19] 孙新城,景建洲,陈小科.杆状病毒的生态学和流行病学研究进展[J].河南农业科学,2007(10):16-18
- [20] 孙修炼,胡志红,彭辉银.杆状病毒生态学研究的进展[J]. Virologica Sinica, 2006(2):200-206
- [21] James R. Fuxa. Ecology of insect nucleopolyhedroviruses[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2004,103(1):27-43