增效物质对 AcMNPV-AaIT 感染的增效作用

王玲玲* 李 俊 张 涛 秦 利**

（沈阳农业大学生物技术学院 沈阳 110161）

Substances enhancing infection of AcMNPV-AaIT. WANG Ling-Ling*, LI-Jun, ZHANG-Tao, QIN-Li**

(*Department of Biological Technique, Shenyang Agricutural University*, shenyang 110161, China)

Abstract In this paper, the recombinant AcMNPV-AaIT and beet armyworms, *Spodoptera exigua* (Hübner), are used as experimental materials. Depending on the modified droplet feeling method, it is studied that the enhanced matter enhanced synergistic effect of infection to virus. It is selected and verified that Cogon Red has greater synergistic effect of infection.

Key words enhanced matters, Cogon Red, AcMNPV-AaIT, *Spodoptera exigua*

摘 要 以苜蓿尺蠖蛾核型多角体病毒的基因重组型病毒(AcMNPV-AaIT)及甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (Hübner)为材料，采用室内添食法研究增效物质对该病毒感染增效作用，筛选出对重组病毒具有感染增效作用的物质—刚果红。

关键词 增效物质，刚果红，AcMNPV-AaIT，甜菜夜蛾

苜蓿尺蠖蛾核型多角体病毒(*Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus, AcMNPV)是一种宿主范围较广的昆虫杆状病毒，能感染30多种鳞翅目昆虫，尤其对甜菜夜蛾具有较高的感染致病力[1,7]。由于其杀虫速度及杀虫效果与化学农药相比还存在一些缺点，因此人们采用基因重组方法构建重组病毒AcMNPV-AaIT，并研究了其对甜菜夜蛾的毒力效果。增效物质能增强昆虫杆状病毒对昆虫的感染致病力，如荧光增白剂等[2]。本试验在已有研究的基础上，筛选对AcMNPV-AaIT具有感染增效作用的增效物质。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

供试昆虫病毒：AcMNPV-AaIT由美国加利福尼亚大学提供，本研究室保存。供试甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (Hübner)：由中国科学院动物研究所提供。增效物质：刚果红、卵磷脂、硼酸购自沈阳医药股份有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 病毒的制备及含增效物质的病毒溶液配制：接种AcMNPV-AaIT并收集感病幼虫，提纯多角体[3]，确定病毒溶液浓度为 2.4×10^9 PIB·mL^{-1}。将病毒原液配制为 2.4×10^3，2.4×10^4，2.4×10^5，2.4×10^6，2.4×10^7 PIB·mL^{-1} 5个浓度，再配制成含有1%增效物质的5个浓度病毒溶液。病毒对照组溶液为100 μL病毒溶液加入100 μL的无菌水；空白对照组为只添食等量的无菌水。

1.2.2 卵期添食增效物质的感染增效作用：选取颜色将要转变为灰色的卵块3块，每块50粒卵，用5%的甲醛溶液消毒20 min，无菌水清洗2次，自然晾干。分为3个组，即添加含1%增效物质刚果红的病毒溶液(10^6 PIB·mL^{-1})组、病毒对照组以及空白对照组。用毛笔蘸取上述溶液涂在卵表面，调查幼虫死亡率等。

1.2.3 幼虫期添食增效物质对AcMNPV-AaIT的感染增效作用：选取发育一致的幼虫放入试管中，每管1头，饥饿12 h。将配制好的病毒溶液8 μL滴在体积为0.4 cm×0.4 cm×0.4 cm饲料上，每组30头幼虫，待幼虫食净后更换新饲料。调查幼虫死亡率及存活幼虫的化蛹率、蛹

* E-mail：w-l-l 1001@163.com

** 通讯作者，E-mail：qinli@syau.edu.cn

重登收稿日期：2007-01-17，接受日期：2007-02-09

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

重、羽化率。

1.2.3　不同浓度的刚果红对 AcMNPV-AaIT 的感染增效作用：将刚果红配成浓度为 0.5%，1%，1.5%，2%的溶液，分别添加于浓度为 10^6，10^5，10^4 PIB·mL^{-1} 的病毒溶液中，每组 30 头 3 龄幼虫，每头 5 μL，重复 3 次。以健康幼虫、添食刚果红和添食病毒的幼虫作为对照。增效比值测定按孙云沛法计算[4]：

增效比值(SR)＝a 制剂的 LD_{50} /（a＋b）制剂混合的 LD_{50}。

2　结果与分析

2.1　卵期添食增效物质的感染增效作用

卵面接种病毒后孵化幼虫的存活率及死亡率见表 1。接种病毒组卵的孵化与对照组卵孵化无明显差异，但接种病毒组卵孵化出的幼虫在第 6 天死亡率达 55.4%，明显高于无菌水对照组。添加 1%刚果红的病毒组在第 6 天的死亡率为67.5%，略高于病毒对照组。

表 1　卵面接种病毒后幼虫孵化率、幼虫累积死亡率

增效物质	供试卵数（头）	孵化率（%）	累计死亡率(%)			
			3	4	5	6(d)
1%刚果红＋Virus	49	92.1	21.6	45.3	60.7	67.5
Virus comparison	48	91.7	18.4	39.6	54.2	55.4
Comparison	44	90.9	6.8	11.4	13.6	13.6

*病毒浓度为 1.2× 10^6 PIB·mL^{-1}。

2.2　幼虫期添食增效物质对 AcMNPV-AaIT 的感染增效作用

感染 AcMNPV-AaIT 的幼虫死亡前出现痉挛症状，表明 AaIT 基因得到表达。随重组病毒接种浓度的提高，幼虫的感染死亡率也升高，甜菜夜蛾对重组病毒的抗性随着龄期的增加而增强。同时，添加刚果红和卵磷脂后的重组病毒对幼虫的感染致病力明显增强(表 2)。3 龄期添加刚果红组的回归方程为 $Y=0.8489x+1.676$；卵磷脂组的回归方程为 $Y=0.7725x+1.268$；而病毒对照组的回归方程为 $Y=0.5172x+2.199$。

表 2　甜菜夜蛾幼虫感染 AcMNPV-AaIT 的死亡率

增效物质	接种浓度（PIB·mL^{-1}）	死亡率(%)		
		2 龄	3 龄	4 龄
刚果红＋Virus	10^7	100.0	100	85.2
	10^6	96.5	93.1	71.5
	10^5	84.7	82.7	64.3
	10^4	48.3	51.7	46.5
	10^3	38.0	31.0	
卵磷脂＋Virus	10^7	100.0	100.0	89.3
	10^6	79.3	86.2	64.3
	10^5	48.3	77.9	44.9
	10^4	41.4	57.9	41.4
	10^3	20.7	37.2	
Virus comparison	10^7	80.1	85.7	82.7
	10^6	62.0	54.1	58.6
	10^5	51.0	38.0	34.5
	10^4	44.4	30.0	17.3
	10^3	34.9	11.4	

表 3　甜菜夜蛾幼虫感染 AcMNPV-AaIT LD_{50}、LT_{50}以及增效比值

增效物质	2 龄			3 龄			4 龄		
	LD_{50}	LT_{50}	增效比值	LD_{50}	LT_{50}	增效值比	LD_{50}	LT_{50}	增效比值
刚果红＋Virus	12.3	3.06	29.52	16.64	3.26	31.20	51.9	4.83	26.67
卵磷脂＋Virus	55.03	4.21	6.60	135.2	4.11	3.84	191	5.12	7.25
Virus comparison	363.1	5.85		519.1	6.33		1384	6.22	

在幼虫期添食增效物质后，幼虫的 LD_{50}、LT_{50}以及增效比值见表 3。3 龄幼虫，病毒对照组的 LD_{50}为 519.1，而刚果红组的 LD_{50}为 16.64，LT_{50}比病毒对照组缩短了 3.07 d；卵磷脂组的为 135.2，LT_{50}比病毒对照组缩短了 2.22 d。添加增效物质后，刚果红的增效比值较大。由此说明增效物质刚果红的增效作用最大，卵磷脂次之。

2.3　AcMNPV-AaIT 对蛹期和羽化率的影响

5 龄幼虫期添食 AcMVPV-AaIT，发现在添

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.n

加增效物质刚果红组幼虫不能蛹化成正常蛹的比例明显增高，镜检发现蛹内含有病毒多角体，说明已被病毒感染。在病毒溶液浓度为108 PIB·mL^{-1}时，添加刚果红组的化蛹率为59.4%，病毒对照组为66.7%，而空白对照组为100%，说明添加刚果红后，化蛹率降低了7.3%。AcMNPV-AaIT在甜菜夜蛾的幼虫化蛹后仍可继续影响蛹的羽化率，添加刚果红组仅有半数的蛹可以羽化为成虫，明显低于病毒对照组蛹的羽化率(表4)，仅为45%和54.2%，镜检未羽化蛹，发现有大量的病毒多角体。

表4 AcMNPV-AaIT对甜菜夜蛾羽化率的影响

增效物质	接种浓度 (PIB·mL^{-1})	处理蛹数 (头)	羽化数 (头)	羽化率 (%)
刚果红+Virus	10^6	20	9	45.0
	10^4	24	13	54.2
卵磷脂+Virus	10^6	22	15	68.2
	10^4	26	20	76.9
Virus comparison	10^6	24	20	83.3
	10^4	26	21	80.8

2.4 不同浓度的刚果红对病毒的感染增效作用

当增效物质的浓度不变时，混配药剂的杀虫效果随病毒溶液浓度的增大而增加；当病毒溶液浓度不变时，刚果红的浓度在1%时的增效作用最强(表5)。

表5 不同浓度的刚果红对AcMNPV-AaIT的感染增效作用

接种浓度 (PIB·mL^{-1})	病毒浓度 (PIB·mL^{-1})	增效物质浓度(%)
10^5	0.5	93.1
	1	96.6
	1.5	82.7
	2	75.9
	0	55.6
10^5	0.5	81.5
	1	85.2
	1.5	74.1
	2	66.7
	0	40

3 讨论

通过试验，筛选出了对AcMNPV-AaIT具有增效作用，并且价格低廉的病毒感染增效物质。研究发现，刚果红、卵磷脂等化学物质对AcMNPV-AaIT都具有增效作用，其中刚果红的增效作用最强，增效比值约为30，有报道硼酸对昆虫病毒感染有增效作用，但在本试验中未发现。卵期添食增效物质后，AcMNPV-AaIT对甜菜夜蛾卵的孵化率没有显著影响，幼虫孵化后具有取食卵壳的习性，卵壳表面粘有病毒，因此增加了幼虫在孵化后的死亡率，使添食病毒组和添食增效物质组比空白对照组的死亡率高。

AcMNPV-AaIT对甜菜夜蛾幼虫的敏感性不同。龄期越小，敏感性越高，不仅致死率高，致死速度也快，致死所需的多角体数目也少，即LD_{50}基本上随着龄期的增加呈上升趋势。添加增效物质组和病毒对照组对2、3龄幼虫致死作用最强，增效物质可增强病毒对昆虫的感染致病力。同时也说明，重组病毒对甜菜夜蛾幼虫的防治最好选择在甜菜夜蛾的3龄前进行，这与有关报道相一致[5]。

昆虫病毒对宿主昆虫不仅有直接的致死作用，并且具有很强的弱化作用，表现为感染病毒幼虫的取食和生长发育受阻，对病原的抵抗力降低，容易发生病害，尤其是添加了增效物质后的重组病毒对昆虫生理过程的弱化作用更强[6]。本研究也表明，在添加增效物质刚果红或卵磷脂后，幼虫化蛹的蛹重以及羽化率都较病毒对照组低，说明添加增效物质后，重组病毒AcMNPV-AaIT对昆虫的弱化作用增强了。

参 考 文 献

1 侯建文，赵烨峰，姚国强，蒋伟民，杨文勤. 中国病毒学，1998，**13**(4)：345～350.

2 秦利，张涛，国见裕久，刘涛. 沈阳农业大学学报，2002，**33**(3)：191～194.

3 侯建文，赵烨烽，蒋伟民. 植物保护学报，1999，**26**(4)：343～346.

4 Sun Y. P., Johnson E. R. *Econ. Entomol.*, 1960, **53**: 887～892.

5 李广宏，陈其津，庞义. 中国生物防治，1999，**15**(4)：178～182.

6 张忠信，张光裕，彭辉银，陈新文. 中国病毒学，1995，**10**：56～60.

7 张纯胄，胡丽秋，杨捷，陈文华. 昆虫知识，2006，**43**(2)：248～250.

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n