

斜纹夜蛾核多角体病毒病的初步研究

生物学系昆虫学专业昆虫病毒研究小组

斜纹夜蛾 (*Prodenia litura* Fabricius) 属鳞翅目夜蛾科, 是我国粮棉、经济作物和蔬菜的重要害虫之一。多年来以化学防治为主, 害虫产生了抗药性, 用药量逐年提高, 增加了作物、特别是蔬菜上的残毒, 直接影响了人体健康。且该虫对苏芸金杆菌类生物农药又不敏感。为了减少环境污染, 探讨新的防治方法, 便具有重要的实践意义。

斜纹夜蛾幼虫病毒病从一九一三年起, 先后由 Dudgeon 和 Bahgat 在埃及发现, 五十年代中期, Abul-Nasr 确定了这种病是核型多角体病毒病, 室内实验能使斜纹夜蛾大量死亡, 这就引起人们的极大重视。一九六〇年戴冠群对广州地区的这种病毒进行了研究。一九六四年, 中国科学院的科学工作者在河北、广州、南昌等地也找到了感染核型多角体和颗粒体病毒病的死虫。无产阶级文化大革命, 有力地推动了我国的科学研究工作。一九七二至一九七三年, 云南省保山潞江棉作试验站的实验表明, 利用这种病毒防治害虫效果显著。一九七五年, 黄冠辉、丁翠对这种病毒病进行了一系列研究。一九七五年开始, 广州市新滘公社联新大队和广州市微生物研究所协作, 在蔬菜上应用这种病毒防治斜纹夜蛾取得了良好效果。

本文报导了斜纹夜蛾幼虫核型多角体病毒的形态、幼虫感染及病毒保存等试验结果, 为利用这种病毒防治斜纹夜蛾提供参考。

材 料 和 方 法

病毒品系: 一九七五年四月广州市微生物研究所采自本市联星大队蔬菜地的病虫, 经我们室内虫体繁殖而得。

病毒繁殖: 用每毫升约含100万左右多角体的死虫组织液(滤过的), 涂在蔬菜叶片上, 稍干后即用以饲养虫室内三至四龄的斜纹夜蛾幼虫。1—2天后改用清洁叶片。注意经常检查发病情况, 随死随收, 避免活虫吃死虫或因死虫腐烂而无法收集。死虫涂片(用什维佐娃或坡赫法染色)在光学显微镜下检查有无多角体。

病毒保存: (1)、将染病死虫直接装入洗净的旧青霉素小瓶, 盖好放于4℃冰箱; (2)、将染病死虫或虫尸的捣碎液装于试管(或小瓶中), 加甘油和少许青

霉素, 放于4°C冰箱; (3)、将染病死虫经离心获得粗提纯的多角体, 分装于安培瓶内(约0.1毫升), 经冰冻真空干燥(约20小时), 在真空下将安培瓶封口, 置于4°C冰箱。

多角体的提纯和观察, 根据多角体的比重(约1.28), 我们采用离心的方法分离和提纯多角体。即将死虫用捣碎机或研钵捣碎, 加蒸馏水稀释, 经尼龙纱过滤, 以200—500转/分, 离心3—5分钟, 除去组织碎片及大块杂质, 将含有多角体的上清液, 以5000转/分, 离心20分钟, 除去上清液, 把沉淀悬浮于0.25%洗衣粉水溶液中, (PH=7), 匀浆3分钟又以5000转/分, 离心20分钟, 弃去上清液, 将沉淀物悬浮于约为沉淀物体积30倍的蒸馏水中匀浆12分钟, 然后把匀浆液注入装有4厘米厚、特定密度为1.3(61.7% w/w)的蔗糖溶液的离心管中, 以6000转/分, 离心30分钟, 多角体就集结于蔗糖液和水之间, 较重的不纯物质进入蔗糖液中或沉在离心管底部。取含有大量多角体的中间层加十倍蒸馏水匀浆6分钟, 注入具有特定密度1.20(43.9% w/w)蔗糖液上, 7000转/分, 离心30分钟, 白色的多角体就沉到离心管底部。最后将多角体悬于30倍蒸馏水中, 以5000转/分反复离心洗涤二次, 便可获得纯的多角体。多角体滴于一张小载片上, 用黄金喷涂, 在HSE-2扫描电镜观察。

病毒粒子, 根据核型多角体可被弱碱溶解的特性, 将约57毫克纯多角体加入12毫升0.01M Na_2CO_3 加0.05M NaCl 混合液中, 在室温下溶解4小时, 以2000—4000转/分, 离心10分钟, 上清液以10000转/分, 离心1小时, 除去上清液, 沉淀加入少许无 CO_2 的双蒸水, 再以10000转/分, 离心1小时, 可获得大量病毒粒子, 加少量的无 CO_2 双蒸水, 滴在载网上, 磷钨酸负染, Hu-12A电镜观察。

组织石蜡切片及多角体的超薄切片, 将感病垂死的虫体在蒲安液(Bouin's fluid)中固定4小时, 石蜡包埋, 切片6微米, 用苏木精及伊红染色, 于光学显微镜下观察并照相。将提纯的多角体放于Palade 饿酸固定液中固定4小时, 酒精浓度递增脱水, 甲基丙烯酸脂包埋(多角体也可在干燥器中干燥后直接包埋), 然后在LKB8800型超薄切片片机切片, 厚度约500Å, 切片以醋酸铀染色1.5小时, Hu-12A电镜下观察并照相。

生物测定, 将染病死虫磨碎, 尼龙纱过滤, 血球计数器计数, 稀释至所需浓度, 用毛笔涂抹蓖麻叶表背两面, 湿润为止, 晾干后, 恒温下饲喂2龄幼虫, 24小时后换无病毒鲜叶。7天内逐日记录死亡数, 死虫抽样检查, 是否属病毒致死, 并求出致死中浓度(LC50)。用同样处理方法, 在不同温度、相同病毒浓度条件下, 测定幼虫对病毒的敏感性。

田间治虫试验, 1975年7月至8月, 在广州新滘公社联星大队农科站的0.4及0.5亩蔬菜田进行试验。先将病虫尸体用捣碎机捣碎, 纱布过滤并计数, 配成约 2×10^7 多角体/毫升的悬液, 加少量洗衣粉用喷雾器喷雾, 同时用井水喷雾作对照。逐日调查, 测定防治效果。

实验结果

一、斜纹夜蛾核型多角体病毒病的特征

染病幼虫的最大特点是发育缓慢，体色常在感病三天后变灰白，行动迟钝，还有严重的相杀现象。在同一养虫缸出现死亡时，若不及时取出，其他垂死的病虫便很快将死虫吃光（健康虫很少存在此现象）。病虫常倒挂在植物和养虫器材上死亡（图一）。一旦死亡，皮肤微触即破或自行破裂，流出乳白色的稍带腥味的体液。此时涂片观察，高倍镜下可看到折光性较强的多角体。经甲醛酒精液固定，1% NaOH 处理，5% 伊红水溶液染色后，在油镜下可清晰看到粉红色的多角体。若用1%孔雀绿处理1分钟，再用1%苦味酸处理5分钟，被染成金黄色的多角体和被染成绿色的其他组织便形成明显的对照。石蜡切片观察，染病幼虫主要病变发生于被侵染的细胞核内，尤其在表皮、脂肪体和气管细胞核中更为繁多，甚至在生殖系统组织中也可看到（图二）。

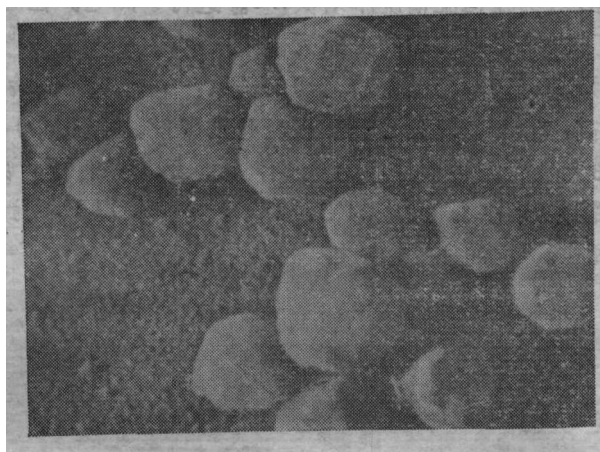


图一 感病毒病死亡的斜纹夜蛾幼虫



图二 斜纹夜蛾幼虫感病后的体壁细胞示胞核充满多角体

光学显微镜和电子显微镜下观察表明，斜纹夜蛾多角体呈不规则多角形，多数为五角形或六角形，大小变化很大，直径从1.0至4.67微米，平均2.4微米。用黄金喷涂，扫描电镜观察，为不规则的表面有隆起的多角体（图三）。用弱碱溶解多角体外壳，释放出的病毒粒子，和纯多角体的超薄切片表明，目前联星大队蔬菜地流行的是核型多角体病毒病。多角体含有许多的杆状病毒粒子，粒子在多角体内，常常是成束存在，每束所含的病毒数量从2—10，也有单个存在。初步测定，粒子直径约为200—300Å，长2000—4000Å（图四）。



图三 斜纹夜蛾幼虫核型多角体(电子显微镜扫描像, $\times 7500$)

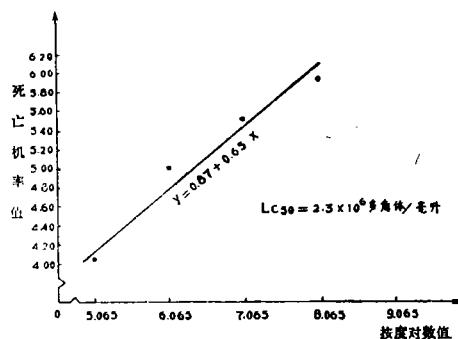


图四 斜纹夜蛾幼虫核型多角体的超薄切片示病毒束

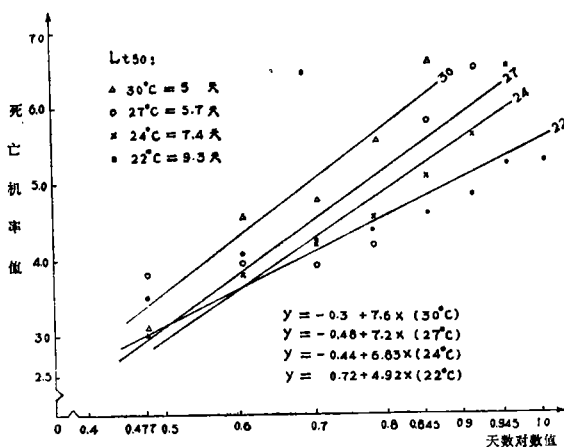
二、斜纹夜蛾核型多角体病毒病的生物测定

斜纹夜蛾核型多角体病毒是一种毒力较强的病原微生物,在一定的条件下,能引起斜纹夜蛾幼虫大量死亡。实验表明,高浓度、高温、多次饲喂情况下,1—5龄幼虫均可感染死亡。以2—4龄最为敏感,5—6龄幼虫在较低温度条件下,患病率较低,化蛹后有相当数量在蛹期死亡。我们在室温条件下对2、3、4龄幼虫 LC_{50} 测定的

基础上,重点对二龄幼虫在恒温情况下对其 LC_{50} 进行了测定。在温度 27°C 及相对湿度 $70-90\%$ 条件下,病毒对二龄幼虫致死中浓度 LC_{50} 为 2.3×10^6 多角体/毫升,(图五)。斜纹夜蛾的感病率与温度有密切的关系,同一浓度、龄期,温度高,死亡速度快,死亡率高;温度低,死亡速度慢,死亡率低。(图六)。 22°C 时,致死中时(Lt_{50})为9.3天,而在 30°C 时, Lt_{50} 只有5天。 22°C 条件下,感病10天后只有60%死亡,其余均能陆续化蛹;而在 24°C , 27°C , 30°C 情况下,分别都在第10、第9、第8天100%死亡。



图五 核型多角体对斜纹夜蛾二龄幼虫的死亡曲线



图六 感染核型多角体的斜纹夜蛾幼虫在不同温度条件下的反应

三、病毒使用与保存试验

1、1975年7月至8月,在联星大队农科站的蔬菜田试验,经喷洒核型多角体后,斜纹夜蛾幼虫在第四天开始死亡,第6、7天达死亡高峰,防治效果达80%。特别在虫口密度大、气温高的情况下,结果尤为明显。

2、采用上述三种方法,在4℃冰箱保存5个月以上仍具有很强的杀虫能力,没有失毒,特别是冰冻干燥后更宜于长期保存。

讨 论

斜纹夜蛾核型多角体病毒繁殖方法比较简单,易于土法生产,幼虫在一定的条件下,对它又具有高度的敏感性,特别是在广州市郊区,7—9月份温度较高,斜纹夜蛾又是危害最严重的时候,使用这种病毒防治该虫是很有可能的。当前的问题是病毒杀虫效果较慢,因此,深入研究病毒的作用机理,选育毒性高的品系,探讨合适的使用方法是重要的。特别是要深入地研究该虫人工大量繁殖和对高等动物的安全问题,以便向着病毒的工业化生产发展。

主要参考资料

- [1] 黄冠辉、丁翠, 1975. 斜纹夜蛾核多角体病毒病的研究. 昆虫学报 18(1): 17-23.
- [2] 蒲莹龙等 1961. 温度对斜纹夜蛾生长发育的影响. 中山大学学报 4: 27-34.
- [3] 戴冠群 1973. 广州地区斜纹夜蛾的多角体病的初步研究. 昆虫学报 16(1): 89-90.
- [4] B.N比留佐娃等著 1963 (王大成译), 生物材料的电子显微镜研究方法.
- [5] Bergold. G. H. & B. Flaschotrager 1957. The Polyhedral Virus of *Prodenia litura* Fabr. (*Lepidoptera: Noctuidae*). Nature (Lond) 180: 1046-47.
- [6] Harpaz, I. and Y. Ben Shaked 1964. Generation-to-Generation Transmission of the Nuclear Polyhedrosis Virus of *Prodenia litura*(Fabr.) J. Invert. Pathol. 6(1), 127-129.
- [7] Smith. K. M 1967. Insect Virology.
- [8] Steinhaus. E. A. 1963. Insect Pathology Vol. I.
- [9] Van der Geest L. P. S. 1968. A Method for the Purification of Polyhedra. J. Invert. Pathol. 11: 502.