

编号: 0199

科学技术成果报告

昆虫病毒的研究

科学技术文献出版社

Q965

9.8-2

科学技术成果报告

昆虫病毒的研究

编辑者：中国科学技术情报研究所

出版者：科学技术文献出版社

印刷者：中国科学技术情报研究所印刷厂

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

开本：787×1092¹/₁₆ 印张：2.5 字数：64千字

1982年7月北京第一版第一次印刷

印数：1—2,800册

科技新书目：24—52

统一书号：16176·88 定价：0.55元

目

录

前言

一、斜纹夜蛾幼虫核多角体病毒 (NPV) 的研究	(2)
(一) 症状及组织病变	(2)
(二) 多角体、病毒粒子的形态及其超微结构	(3)
(三) 病毒毒效的生物测定	(3)
二、斜纹夜蛾核多角体病毒制剂的实验室生产	(5)
(一) 人工饲料的成份和制备方法	(5)
(二) 斜纹夜蛾幼虫的人工饲料饲养	(6)
(三) 病毒的繁殖和制备	(6)
(四) 制剂毒效的生物测定	(7)
(五) 结果与讨论	(7)
三、斜纹夜蛾核多角体病毒 (DNA) 的研究	(9)
(一) 研究方法	(9)
(二) 结果与讨论	(11)
四、马尾松毛虫的质型多角体病毒 (CPV) 的研究	(11)
(一) 材料及方法	(11)
(二) 观察研究结果	(12)
五、蓖麻蚕核多角体病毒病的研究及其预防试验	(15)
(一) 材料及方法	(15)
(二) 结果与讨论	(17)
六、稻纵卷叶螟颗粒体病毒 (GV) 的研究	(20)
(一) 材料与方	(20)
(二) 结果与讨论	(21)
七、菜粉蝶幼虫的颗粒体病毒的初步研究	(23)
参考文献	(37)

昆 虫 病 毒 的 研 究

蒲蛰龙、叶育昌、庞义、杨承炽、赖涌流、陈其津、利翠英

(中山大学昆虫研究所)

前 言

本世纪四十年代以来,利用昆虫病毒防治农林害虫,引起了人们的极大注意,在许多先进国家,已陆续应用于生产实践。如美国已注册用于生产的昆虫病毒,有棉铃虫、黄杉毒蛾(*Hermerocampa pseudotsugata*)及舞毒蛾(*Lymantria dispar*)的核多角体病毒;加拿大准备注册应用的有苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*)、云杉卷叶蛾(*Choristoneura fumiferana*)、松红头叶蜂(*Neodiprion lecontei*)的核多角体病毒及苹果蠹蛾(*Laspeyresia pomonella*)的颗粒体病毒,已应用的有棉铃虫、黄杉毒蛾及舞毒蛾核多角体病毒;澳大利亚注册应用的有棉铃虫核多角体病毒,研制中的有菜白蝶颗粒体病毒;苏联生产了蔬菜夜蛾(*Memestra bonstilae*)、天幕毛虫(*Malacosoma neustria*)、舞毒蛾的核多角体病毒及美国白蛾(*Hyphantria cunea*)的颗粒体病毒;日本用于防治赤松毛虫的质多角体病毒在1974年注册使用,用于防治斜纹夜蛾的核多角体病毒,也大量生产使用^[7];此外许多国家也在应用病毒治虫。我国近十多年来,各地也开展了应用核多角体病毒防治棉铃虫^[1]、舞毒蛾^[2]和斜纹夜蛾^[3],应用质多角体防治赤松毛虫^[4]、马尾松毛虫^[5]及木毒蛾^[6],应用颗粒体病毒防治菜青虫等的研究。

感染昆虫及螨类的病毒,至1975年止,已发现达七百余种^[8],我国至1980年纪录也达五十余种。由于利用病毒防治害虫的试验研究及在生产实践上应用均较迟(如美国最早应用的棉铃虫病毒,1975年才注册使用),因而直到今天,全世界能用于生产实践的还不多,但一经应用,效果显著。类群多、效果大、应用少,这些事实,正好说明昆虫病毒防治害虫的巨大潜力,它的确是值得探索的一种资源。

病毒是结构最简单而又具有特异结构最小的生命单位,是研究生命科学的一个好材料。事实上,以病毒为材料的纯理论或应用理论研究工作,近数十年来是十分活跃的。昆虫病毒方面,近年来也有从物理结构及电镜研究移向化学及分子结构研究的趋势。因此,对昆虫病毒的研究,在实践上及理论上都有特殊意义。

本所自1973年以来,组织部分力量,陆续从事昆虫病毒的理论和应用的研究。现将几年来主要研究工作加以整理报道。本报道包括:(1)斜纹夜蛾核多角体病毒研究,主要研究者为蒲蛰龙、庞义、叶育昌、杨承炽、利翠英、黄献文等;(2)马尾松毛虫质多角体病毒研究,主要研究者为蒲蛰龙、庞义、赖涌流;(3)蓖麻蚕核多角体病毒研究,主要研究者为叶育昌;(4)稻纵卷叶螟颗粒体病毒的研究,主要研究者为庞义、陈其津;(5)菜青虫颗粒体病毒的研究,主要研究者为庞义、叶育昌、蒲蛰龙。

本研究工作承中山大学电子显微镜实验室、广东省林业科学研究所及广东省斗门县林业

局、恩平县农业局、广州市微生物研究所、广州市新滘公社联星大队农科站等单位大力支持，并由东北林学院岳书奎同志担任部分研究工作及本校1972届学生黄献文、梁庆生、李建魁、赵明礼、张文兰等同志协作部分研究工作。对上述各单位及人员的热情支持与合作，谨表谢忱。

一、斜纹夜蛾幼虫核多角体病毒(NPV)的研究

斜纹夜蛾(*prodenia litura*)是我国粮、棉、经济作物和蔬菜的重要害虫之一，为害多种作物。据室内试验，该虫喜吃的植物有90种之多。主要寄主有棉、甘兰菜、甘薯、芋、花生、大豆、蓖麻、红花草、蕹菜、芝麻，还为害水稻、甘蔗、黄麻、菸草等作物。斜纹夜蛾分布广，国内南起广东海南岛，最北可至辽宁，西至青海(东部)、东达沿海各省及台湾^[9]。

斜纹夜蛾在湖北、江苏一年发生五代；湖南、江西六代；福建、广东七代；在我国许多地区，可整年为害。

防治斜纹夜蛾，多年来以化学防治为主，害虫产生了抗药性，致使用药量不断提高，增加了农作物，特别是蔬菜上的残毒，影响人体健康。近二十年来，许多地方利用苏芸金杆菌防治多种鳞翅目害虫，颇有成效，且可减少因使用化学农药而造成的环境污染。但该杆菌对斜纹夜蛾幼虫无效。因此，寻求有效的而又能减少环境污染的防治方法，很有必要。关于斜纹夜蛾多角体病毒病，最早的报道见于1913年。当时曾在埃及建议用来防治棉花上的斜纹夜蛾幼虫^[10]。其后，曾在埃及利用这种病毒防治棉田斜纹夜蛾^[12,13]。国外对这种病毒的研究，五十年代以来也有一些报道^[14,15]。在我国，云南省保山潞江棉作试验站于1972至1973年的试验表明，利用这种病毒防治害虫，效果显著。斜纹夜蛾核多角体病毒(NPV)的形态特征、感染力、田间治虫试验等研究，逐有报道^[10,11,3]。1975年开始，广州市新滘公社联星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。

我们于1975年开始进行应用NPV防治斜纹夜蛾的研究，并探讨其中有关的理论问题，主要包括病虫症状、组织病变、病毒的超微结构、毒效生物测定、田间防治害虫试验、病毒大量繁殖及病毒脱氧核糖核酸的研究。现分述如下。

(一) 症状及组织病变

1. 材料及方法

用每毫升约含100万多角体的死虫组织液，经镜检无细菌及其他微生物之后，涂于蕹菜叶片上，稍干后即用以喂饲在室内饲养的三至四龄的斜纹夜蛾幼虫，1—2天后改用清洁叶片，经常检查及观察发病情况，记录病变。

组织病理的研究材料的准备，是将感病垂死的虫体切成小片段，在Bouin氏液固定4小时，用50%乙醇充分洗净，保存于70%乙醇内备用。研究材料的制备：将固定的虫体片段经乙醇脱水，石蜡包埋，切片厚6微米，用Hamm染液或苏木精与伊红染色，光学显微镜观察。

2. 观察及研究结果

染病幼虫的最大特点是发育缓慢，体色常在感病后三天由黑变为灰白，具光泽，有时感病后体色粉红，行动迟钝，病虫食欲不振，3—8天死亡。病虫有严重的互残现象，在集体饲养中，垂死的病虫往往很快被吃掉。后期，病虫常向上爬，以腹足倒挂在植物和养虫器材

上死亡(图版 I .1)。死亡后,皮肤微触即破或自行破裂,流出乳白色而稍带腥味的体液,但无恶臭。体液内充满多角体。死虫体液流出后,常留下一层干瘪的体壁。

幼虫食入病毒多角体后,经 2—3 天,血液变得浑浊,涂片镜检,可见血细胞变形,多数充满多角体。组织切片检查,体壁、气管上皮细胞及部分脂肪体的细胞核为病毒感染,明显膨胀变形,并为 Hamm 染液染成红色(图版 I .2),此后多角体迅速增多。又经 3—4 天,上述细胞核已为病毒多角体所充满,但消化管壁细胞一般完整无损(图版 I .3)。再经 2—3 天,幼虫的体壁、气管上皮细胞的细胞核几乎全被破坏而崩解,至此,幼虫一般死亡(图版 I .4)。

(二) 多角体、病毒粒子的形态及其超微结构

1. 材料及方法

用匀浆机捣碎刚病死的虫尸,加蒸馏水稀释。

多角体形态的研究,应用光学显微镜、相差显微镜及扫描电子显微镜。用于光学显微镜的观察材料,可将多角体的涂抹玻片经乙醇、甲醛液固定、1%NaOH 处理、伊红染色。应用扫描电镜进行观察时,先将多角体在真空蒸发器中用黄金喷镀,而后进行观察及摄影。

研究病毒粒子的超微结构,先将受病虫体组织(如脂肪体)或纯多角体固定于 4%戊二醛磷酸缓冲液(pH 7.4)中,置冰箱中(约 4°C)经 1½ 小时,作为初次固定。之后用冰冻的磷酸缓冲液洗约 1½ 小时(更换缓冲液 4—5 次)移组织于冰冻的 1%OsO₄磷酸缓冲液中,置冰箱经 1½ 小时作为后次固定。将固定的组织依次经各级乙醇脱水,移入环氧丙烷,包埋于环氧树脂,或用甲基丙烯酸脂包埋。(纯多角体也可在干燥器中干燥后直接包埋)。用 LKB 8800 型超薄切片机切片,厚度约 500 Å,切片用 50%乙酸铀饱和液作初步染色,柠檬酸铅液作后次染色。在 Hu 12 A 电子显微镜观察。将多角体溶解于 0.03M 碳酸钠水溶液中,析出病毒粒子,或经差速离心进一步提纯病毒粒子,而后用 2%—3% 磷钨酸水溶液进行负染。电镜观察及摄影。

2. 观察及研究结果

光学显微镜和电子显微镜下观察表明,斜纹夜蛾核多角体呈不规则形,多数为五角形或六角形(图版 I .5),大小变化很大,直径从 1.0 至 4.67 微米,平均 2.4 微米。在扫描电镜下,为不规则的表面有隆起的多角体(图版 I .6)。每个多角体包含有许多杆状的病毒粒子(图版 I .7)。多角体外有膜,未完全,经稀碱溶解时,留下多角体被掀成折叠状的膜(图版 I .8)。

病毒粒子杆状,大小较一致,直径为 45—50 毫微米,长度为 360—400 毫微米。病毒粒子由外膜、内膜及核心组成。内膜呈螺旋状,紧贴于核心,其外为外膜(图版 I .7,9)。病毒粒子可排成一束,病毒束由同一外膜所包围(图版 I .7)。在核心的一端,往往有一电子致密的小段,似借以吸着另一粒子的一端。(图版 I .10)

(三) 病毒毒效的生物测定

1. 材料和方法

用二龄幼虫为测定材料,试验设六组,一组为对照。将多角体用水稀释成 5 个不同浓度的悬液,使每毫升分别含有 64×10^5 、 32×10^5 、 16×10^5 、 8×10^5 及 4×10^5 多角体。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，并检查是否由病毒感染而死。计算校正死亡率，并将死亡率转换为几率值，以图解法求出致死中浓度。为了探讨不同温度对病毒毒力的影响，我们曾在22°C、24°C、27°C及30°C条件下分别测定2龄幼虫的致死中时（LT₅₀）。

1975年在广州市新滘公社联星大队蔬菜田进行小面积的病毒治虫试验，用每毫升含有 2×10^7 多角体的水悬液喷雾，每亩喷施80斤。喷雾面积为0.4亩，0.1亩为清水喷雾对照。当时田间以三龄虫为主。

2. 测定结果

在温度27°C及相对湿度70—90%条件下，致死中浓度LC₅₀为 2.3×10^6 多角体/毫升（图1）。通过测定，我们发现斜纹夜蛾的感病率与温度有密切的关系：在一定温度范围内，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2）。22°C时，致死中时（LT₅₀）为9.3天；而在30°C时，LT₅₀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。

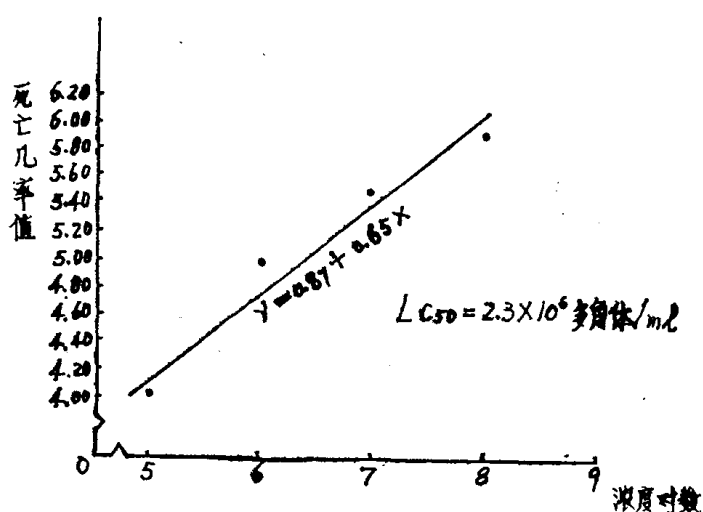


图1 核多角体病毒对斜纹夜蛾二龄幼虫生物测定的 L-C-P 线

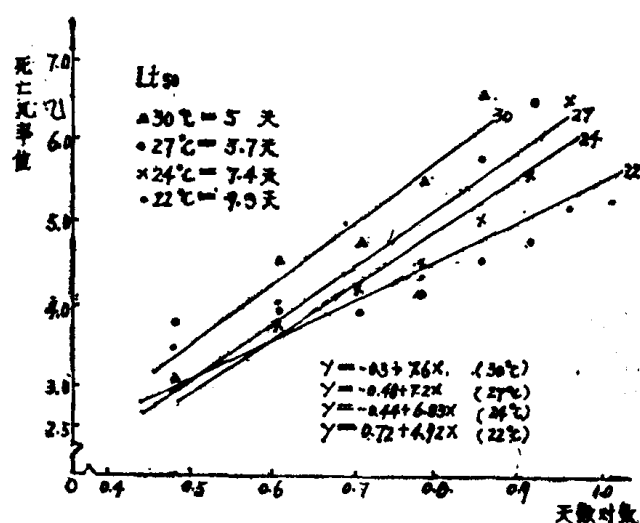


图2 不同温度下核多角体病毒对斜纹夜蛾幼虫的 L-C-P 线

在联星大队田间喷洒多角体防治斜纹夜蛾结果：喷雾前每平方米有斜纹夜蛾幼虫 37 条，喷雾后第四天，幼虫开始死亡，至第七天每平方米只余 8 头，防治效果约 80%。对照区每平方米虫数仍达 30 头。

二、斜纹夜蛾核多角体病毒制剂的实验室生产

室内及田间试验指出，应用斜纹夜蛾核多角体病毒防治斜纹夜蛾幼虫，有稳定效果^[3,11]。如何获得大量的病毒多角体来防治害虫，乃是当前病毒研究的一个重要课题。昆虫病毒是专化性很强的寄生物，目前只能通过活虫体或活细胞进行繁殖^[22,28]。由于细胞培养成本颇高，操作手续又很严格复杂，还不适用于大量生产病毒。所以，当前世界各地，应用人工饲料来连续饲养寄主是进行系统地、大量地繁殖病毒病原体的最好方式^[26,27,28]，对斜纹夜蛾等的习性及饲养有一定的了解及较丰富的经验，可供借鉴^[17,18,19,20,23,24,27,28]。用人工饲料饲养寄主昆虫繁殖病毒，世界上已有小型工厂化生产的例子，美国从 60 年代开始研究实夜蛾核型多角体病毒(*Heliothis NPV*)的生产，就是通过人工合成饲料，半自动化饲养棉铃虫来进行的，成为美国第一个正式注册的昆虫病毒商品制剂^[26]。

1977 年 9 月起，我们研究了斜纹夜蛾幼虫的人工饲料和饲养方法，小批量生产幼虫繁殖核型多角体病毒，并核算成本，以供进一步扩大生产参考。

(一) 人工饲料的成份和制备方法

斜纹夜蛾幼虫的人工饲料，采用如下配方（表 1）。

表1 斜纹夜蛾幼虫人工饲料配方

名 称	数 量	备 注	名 称	数 量	备 注
植物叶粉	15克	如甘蓝叶、芋叶、蓖麻叶、蕃薯叶、蕹菜叶等均可	维生素混合液*	0.1毫升	含甲醛36—38%
黄豆粉	5克		混合盐**	1克	
蔗糖	3克		金霉素	12000单位	
啤酒酵母	2克		福尔马林	0.3毫升	
维生素C	1克		山梨酸	0.06克	
氯化胆碱	0.3克		琼 脂	3克	
			蒸馏水	100毫升	

* 维生素混合液：生物素 6.5 毫克、叶酸 75 毫克、核黄素 150 毫克、盐酸吡哆辛 75 毫克、盐酸硫胺素 75 毫克、尼克酸胺 300 毫克、泛酸钙 300 毫克、维生素 B₁₂ 0.6 毫克、水 50 毫升。

** 混合盐：氯化钠 105 克、氯化钾 120 克、磷酸二氢钾 310 克、磷酸钙 149 克、碳酸钙 210 克、硫酸镁 14.7 克、硫酸锰 0.2 克、硫酸铝钾 0.09 克、硫酸铜 0.39 克、氟化钠 0.57 克、碘化钾 0.05 克。

用于此饲料的植物叶，如甘蓝叶、芋叶、蓖麻叶、蕃薯叶、蕹菜叶等等，取新鲜绿叶，去掉叶柄，置鼓风式干燥器内烘干（温度控制在 60℃ 左右，并经常翻动叶片），粉碎，过 80 目筛，贮存于密封的容器中备用。啤酒酵母和金霉素可用畜用的，也可用医用的片剂，用前均需研碎过 80 目筛。

按规定的量称取各成份。先将琼脂倒入烧杯，加水，置水浴锅中加热、融化，同时，将



278920

蔗糖、黄豆粉、混合盐、植物叶粉拌匀后，倒入一个容量为 1000 毫升的组织捣碎机中，趁热加入融化了的琼脂，以 10000 转/分搅拌 1 分钟，然后加入酵母、维生素 C、氯化胆碱、维生素混合液、金霉素、山梨酸和福尔马林，再搅拌 1 分钟，将混合好的饲料倒进玻璃缸或烧杯，待其自然冷却凝固后，用塑料薄膜封盖，放入冰箱冷藏备用。在 5~10℃ 下保存，可经 1 个月而不变质。

(二) 斜纹夜蛾幼虫的人工饲料饲育

1—3 龄幼虫在直径 12 厘米，高 5 厘米的圆塑料盒(图版 I .11 右)和 18×18×5 厘米的塑料盒(图版 I .11 左)中饲养，这些塑料盒可用市售的糖果盒改用。4 龄以后的幼虫，分杯单个饲养。饲育杯可用市售的儿童水杯改用，上口径为 5 厘米，下底直径为 4.5 厘米、高 6 厘米(图版 I .11 中)，一切用具均须注意清洁、消毒。

在塑料圆盒中平铺一张滤纸，将 3—5 块翌日孵化的卵(约 2000 粒)置于滤纸中央，在卵块周围摆放 3—4 片人工饲料(预先切成 4×1×0.2 厘米的薄片)，上面加盖，置 25—28℃，每天 12 小时光照下饲育，盒内湿度不宜过大，一般以 60% 左右为妥。幼虫孵化后，自行爬向饲料取食。幼虫进入 2 龄时，添加 1—2 片饲料。当幼虫进入 3 龄后，将每盒幼虫分为两半，移入大塑料盒中，同时，加入新鲜饲料(饲料块可稍宽些)，上面盖一层草纸，待幼虫进入 4 龄后，即单个放入塑料杯中饲养。这时取 95% 的幼虫用于繁殖病毒，移至隔离的病毒繁殖室，投喂沾染病毒的饲料块；剩下 5% 幼虫让其继续正常发育传代，给予无毒饲料，这时，饲料块可切成 2×1×0.5 厘米大小。移虫用的工具，是用时钟的钢片发条改制的软镊子，不致损伤虫体。分放了幼虫的一批塑料杯用厚纸片复盖并分层堆叠在一起(图版 I .12)如此饲养处理直至幼虫老熟化蛹，或感病死亡。

留种用的蛹，收集起来放在加有湿润泥土的玻璃缸中，泥土要预先消毒；此后，要经常注意保湿(含水量约 9%)，以使蛹能正常羽化。羽化前将蛹移至纱网笼中，以便成虫在笼中交尾产卵。

另外，亦曾试验过对整个幼虫期都采用群体饲养的方法。大龄幼虫是在带塑料纱盖的木箱(大小为 26×33×6 厘米)中饲养。箱底垫 2 厘米厚的木屑或细土，上面复盖一层草纸，将幼虫及饲料放在草纸上，同时，在箱盖的底面亦加一张草纸复盖。每隔 1~2 天添加一次新饲料，清除旧饲料。要保证饲料充足，如食料不足，将引起幼虫自相残杀。

(三) 病毒的繁殖和制备

病毒的繁殖，是从感染斜纹夜蛾 4 龄幼虫开始的。用于本实验生产的斜纹夜蛾核型多角体病毒原始病株，是从广州市郊区芋地的斜纹夜蛾病死幼虫中分离的，未经任何毒力选择。将 NPV 用蒸馏水配成 2×10^7 多角体/毫升的悬浮液，以每头幼虫 0.2 毫升计，用手持喷雾器喷雾或毛笔涂在切好的人工饲料块表面，然后投喂幼虫。

收集罹病而死和濒死的幼虫，即时处理或贮于冰箱中冷藏一个月内处理。病死虫加少量蒸馏水搅拌，用尼龙纱布隔渣，再加 5 倍体积的蒸馏水，经 10000 转/分的组织捣碎机全速捣碎 3 分钟，置离心机以 6000 转/分离心 40 分钟，弃掉上清液，沉淀物再加蒸馏水以同样转速离心洗涤 2 次，收集病毒多角体。加适量水搅拌使成悬浮液，取样检查并用血球计数器

计数，这时的病毒多角体比较纯净。按计数结果，每 500 亿多角体加轻质碳酸钙 1 克吸附（亦可加增效剂和保护剂，本试制产品中未加），置于加了吸水剂的真空干燥器中干燥，然后磨碎包装，即为成品。成品置冰箱或阴凉干燥处保存。

（四）制剂毒效的生物测定

病毒制品的毒力，用刚脱皮的 3 龄幼虫测定。试验设六组，一组为对照。每组供试幼虫 20~50 头，让其饥饿 4 小时后，进行测试。测试法与前述毒效生物测定相同，不同的只是用滴管将不同浓度多角体悬液分别滴在人工饲料片上。

将病毒制品用水稀释成 5 个不同浓度的悬液，使每毫升分别含有 64×10^5 ， 32×10^5 ， 16×10^5 ， 8×10^5 和 4×10^5 多角体。用滴管分别滴在重量相同的五份人工饲料切片上，投喂供试的幼虫。每个处理设 3~5 个重复。所用的饲料宜少，要求 2 天内食光，以后换以无毒的新鲜饲料。经 7 天后计算死亡率，并用图解法求出致死中浓度（ LC_{50} ）。

（五）结果与讨论

斜纹夜蛾幼虫的人工饲料饲养

用上述人工饲料，经连续五代饲养斜纹夜蛾各龄幼虫，生长发育良好，各龄期与天然饲料饲养的无多大差别（表 2）。幼虫分为 6 龄，末龄幼虫最重者，达 1.47 克/头，平均为 0.95 克/头（以鲜蕃薯叶为对照的平均 0.93 克/头）。幼虫历期 19—22 天，世代历期为 38—47 天。化蛹、羽化、交尾、产卵及幼虫孵化等均正常。羽化率为 90.6%，雌蛾产卵量为 427~1173 粒/头，幼虫孵化率在 95% 以上，可见所用的饲料配方基本适合斜纹夜蛾幼虫的营养要求。据统计，平均每头幼虫在整个历期中消耗饲料为 4.33 克，价值人民币 1.2 分，而实际食下的饲料为 2.89 克，价值 0.9 分人民币。

表 2 不同饲料饲养斜纹夜蛾幼虫的历期及体重

发 育 时 期	人 工 饲 料		新 鲜 蕃 薯 叶	
	历 期 (天)	平均体重 (克/头)	历 期 (天)	平均体重 (克/头)
卵	3—4	—	3—4	—
一龄幼虫	3	—	3	—
二龄幼虫	3	—	2—3	—
三龄幼虫	2—3	—	2—3	—
四龄幼虫	3	—	3	—
五龄幼虫	3	0.13	3	0.10
六龄幼虫	5—7	0.95	4—6	0.93
蛹	13—15	0.27	13—15	0.27
成 虫	3—6	—	3—6	—
世代历期	38—47	—	37—47	—

如果由于没有做好卵面消毒，养虫用具和环境为斜纹夜蛾 NPV 所污染，或养虫盒中湿度过大，也会导致饲养的失败。另外，发现连续繁殖五代以后，虫质有退化变弱的现象。这可能是近亲交配或管理不善造成的。因连续繁殖的代数尚少，故其中的原因还不明了。

根据斜纹夜蛾幼虫的习性，四龄以后的幼虫食量大、性凶猛，分杯单个饲养较之集体饲养为好，这样可以避免互相干扰和自相残杀，成活率高，成长也较快，但若是扩大生产，则需要改革饲养工具，并实行自动化和半自动化操作，美国棉铃虫连续人工饲养，6人每年可生产幼虫66万头，就是通过半自动化的工厂式生产的[26,27,28]。

NPV的大量生产

上述人工饲料饲养的斜纹夜蛾幼虫，用以繁殖NPV，其生产流程如图3所示：

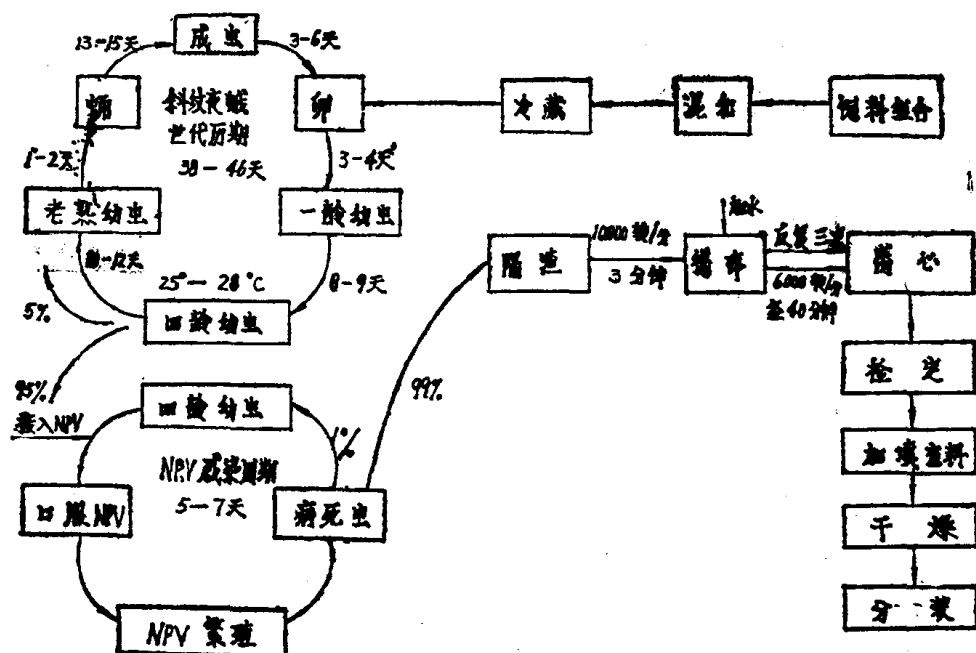


图3 斜纹夜蛾NPV制剂生产流程图

用上述人工饲料饲养所得的幼虫，用于繁殖病毒，平均每头大龄幼虫可繁殖病毒多角体40亿。按接种的病毒多角体量（即每头四龄幼虫 4×10^6 ）计算，NPV在寄主体内增殖了1000倍。这是一个可观的数字。和前人研究的结果相同，接种量的多少及接种幼虫适期，对产量的影响颇大[26]。一般来说，以活虫体繁殖病毒，应该选取合适的虫龄，感染适量的病毒和提供良好的繁殖环境。这样，幼虫生长发育好、病毒又能在虫体内不断繁殖增生，至幼虫老熟才因病而死。这种方法可使病毒获得高产。据本实验所用的病毒株来看，以每头 4×10^6

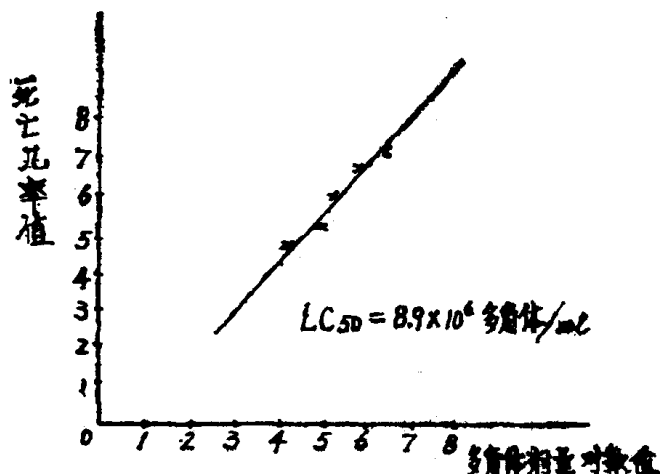


图4 核多角体病毒对斜纹夜蛾三龄幼虫生物测定的L-D-P线

的多角体接种四龄幼虫为好。在 $25^{\circ}-26^{\circ}\text{C}$ 的条件下饲养幼虫，可成活至末龄期才死，因而能获得更高的病毒产量。

以新鲜的蓖麻叶为对照，饲养斜纹夜蛾幼虫，平均每头可繁殖80亿病毒多角体，较上述人工饲料饲养的高出一倍之多。可见，改善人工饲料的营养成分，注意感染期内的饲养管理，对进一步提高病毒的产量，将具有重要的作用。

NPV 制剂的感染力

在室温下放置七个月的 NPV 制剂, 经生物测定的结果, LC_{50} 为 8.9×10^6 多角体/毫升 ($y = 1.89x - 7.1$) (图 4) 感染力与国内曾报道过的同类病毒相差不远^[1,2,3], 但由于测定的方法、条件、时间不同, 这些结果是难以准确地比较的^[21]。而从田间试验的效果来看, 实验室生产的病毒制剂在常温下保存 18 个月, 效果还是肯定的。用 5×10^6 多角体/毫升的剂量, 施用制剂后的第 9 天, 可使调查点的幼虫全部死亡 (见表 3)。如将产品在低温下保存, 效果可能会更好。

表 3 斜纹夜蛾核多角体病毒制剂田间试验效果*

试 验 面 积	施 用 浓 度	调 查 每 平 方 米 虫 数				死 虫 数				备 考
		调查点	3 龄虫	4 龄虫	合 计	第三天	第五天	第七天	第九天	
0.5 亩	5×10^6 多角体/毫升	1	6	3	9	0	1	8	0	
		2	14	8	22	0	0	21	1	
		3	20	7	27	12	6	7	2	
对照区	喷 水	平 均			19.3					
			11	5	16	0	0	0	0	

试验地点: 广州市郊农科站 作物: 芋 时间 1979.7.10

※ 供试的病毒制剂保存于安瓿内, 在常温下经过 18 个月。

三. 斜纹夜蛾核多角体病毒 (DNA) 的研究

Cibalsky 等对一些夜蛾科昆虫核型多角体病毒的多角体蛋白质进行了研究^[31]。Onodera 等报道核多角体病毒 DNA 的提取方法, 并测定家蚕 NPV 的 DNA 分子量为 1.6×10^7 ^[32]。

斜纹夜蛾核多角体病毒核酸 DNA 的研究则未见报道。我们研究了斜纹夜蛾核多角体病毒核酸 DNA 的分离方法及生化性质。现报道如下。

(一) 研 究 方 法

1. 病毒多角体的收集和提纯

用真空干燥保存的斜纹夜蛾病毒, 加 500 倍蒸馏水捣碎混合均匀, 涂于蓖麻叶上饲喂四龄的斜纹夜蛾幼虫, 7 天后收集五龄病死虫尸, 保存于 4°C 冰箱中备用。

将上述收集的死虫, 用玻棒捣碎, 尼龙纱布过滤, 滤液离心 (6,000 转/分) 30 分钟, 收集沉淀物。沉淀物通过蔗糖的密度梯度离心, 再经蒸馏水多次洗涤, 离心, 便可得到白色的病毒多角体。

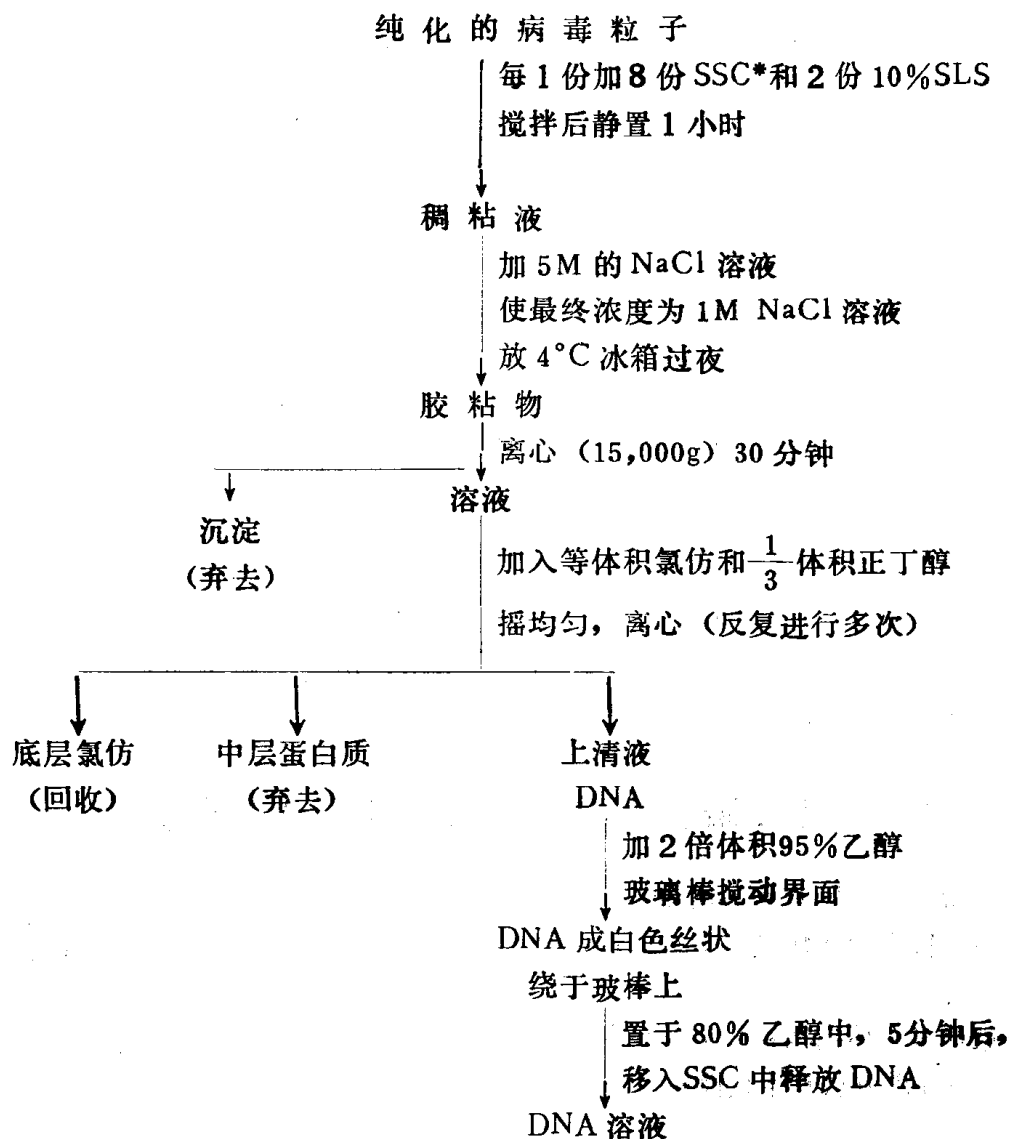
2. 病毒粒子的分离

1 克病毒多角体悬浮在 200 毫升的 $0.006\text{ M Na}_2\text{CO}_3 - 0.05\text{ M NaCl}$ 溶液中, 震荡 1 小时, 离心 ($4,500\text{g}, 0^{\circ}\text{C}$) 15 分钟除去不溶物质。上清液再离心 ($40,000\text{g}$) 30 分钟, 收集

沉淀。用 $0.006\text{M Na}_2\text{CO}_3$ — 0.05M NaCl 溶液洗涤二次，用蒸馏水洗涤一次，再经离心，可得纯化的病毒粒子，产率为 1.5% 。

3. 病毒 DNA 的分离

病毒 DNA 的分离方法，其程序如下：



(二) 结 果 与 讨 论

提取的核酸呈白丝状缠绕在玻棒上, 将玻棒提出液面, 可得到胶状物。

核酸利用细胞色素 C 单层膜展开为单层分子吸附于铜网上, 用醋酸氧铀酰染色后, 直接在电子显微镜下观察 (图版 I. 14), 或铂铱喷镀投影, 电镜下观察 (图版 I. 13)。

通过电子显微镜观察, 测得核酸分子长度平均为 8.3 微米, 分子量为 16.6×10^6 。

讨 论

(1) 用 Telfon 膜时, 核酸分子进行单分子展开效果好。本文采用照像底片代替 Telfon 也得到较满意的 DNA 图样 (图版 I. 13, 14)。

(2) 在核酸展开制样时, 可使用常量液面展开法、微量展开法和微量扩散法等, 其中微量扩散法操作简便, 容易得到满意的结果。

(3) 用醋酸氧铀酰对核酸染色得到的图象较清晰。染色后可不必进行真空喷镀投影。

(4) 我们应用电镜技术观察到的核酸 DNA 的分子量为 16.6×10^6 , 这一数值与家蚕核多角体病毒 DNA 的分子量相当。

四、马尾松毛虫的质型多角体病毒 (CPV) 的研究

1950年首次报道在感染多角体病毒病的灯蛾 (*Arctia caja* 及 *A. villica*) 幼虫分离出一种近于球形的病毒粒子^[47]。接着, 发现这类病毒的多角体是在中肠细胞质内形成的, 因而称之为质型多角体病毒^[48]。

质型多角体病毒病广泛地感染鳞翅目幼虫, 也感染少数双翅目及膜翅目幼虫。据 1975 年报道, 被感染的昆虫已达 147 种, 在病毒感染的昆虫种类中, 仅次于被核型多角体病毒所感染的数目^[8]。

1973 年以来, 在广州市市郊的松林中, 经常发现感染质型多角体病毒病的马尾松毛虫幼虫^[33]。偶然发现核型多角体病毒的感染^[34] (图版 I. 1, 2, 3)。本研究工作的范围, 主要是幼虫感病后的一般病症、器官病变、质型多角体病毒包含体的一般性质以及病毒粒子的超微结构等, 同时进行了对哺乳动物的安全性试验和林间治虫试验。

(一) 材 料 及 方 法

病虫采自广州近郊及附近县份的松林。多角体的检查, 是取病虫中肠组织液或含多角体的粪便涂于载玻片, 甲醇固定 5 分钟, 在沸水浴中热处理 5 秒钟, 1% 溴酚兰染色 5 分钟, 或甲醇固定后, 用稀释的 Giemsa 染色液染 8—12 小时, 在光学显微镜下检查。观察内部器官病变, 先固定病虫的中肠于伯拉苏里 (Brasil) 或普安 (Bouin) 固定液, 进行白蜡切片, 制备切片标本, 观察感病中肠细胞的变化; 白蜡切片厚度一般为 6—8 微米, 染色用 Heidenhain 的铁矾苏木精或咸姆 (Hamm) 染色法^[42]。

用电子显微镜研究多角体及病毒粒子的超微结构。电子显微镜研究材料的制备, 首先用

10000 转/分钟的匀浆器加少量无菌蒸馏水匀浆病虫中肠, 匀浆液用四层尼龙纱过滤。滤液以 500 转/分、1000 转/分、3000 转/分及 5000 转/分的离心速度反复离心, 可得到含有多量多角体的液体, 或用 Van der Geest (1968) 法, 即用蔗糖液提纯多角体^[48], 另外取濒死幼虫中肠切成碎块, 用 2.5% 戊二醛固定 1 小时或更长时间, 再用 1% 四氧化钨或 1% 高锰酸钾固定 1 小时, 经脱水后包埋于环氧树脂或甲基丙烯酸甲脂加甲基丙烯酸丁酯, 用超薄切片机切片, 乙酸铀染色或乙酸铀、柠檬酸铅双重染色。病毒粒子的提纯采用 Miura 等(1968) 的方法^[45]; 经提纯的多角体悬浮于碳酸盐缓冲液中 (pH10.8), 在室温中经 1 小时, 该溶液用 3 倍体积的蒸馏水稀释, 经 8000g 离心 30 分钟, 弃掉沉淀, 悬浮液经 65000g 离心 1 小时, 含病毒粒子的沉淀物悬浮于 40 毫升蒸馏水中并经 2000g 离心 10 分钟, 除去不溶物质。另一种制备是用 0.03M 碳酸钠溶解提纯的多角体, 溶解时间为半小时至 2 小时。含病毒粒子的悬浮液滴在电镀铜网上, 用 2% 磷钨酸负染 5—10 秒钟。上述制备材料, 均用 HU—12A 电子显微镜观察研究。此外, 又用经初步提纯的多角体及由病虫肛门排出的粘液制备供扫描电镜观察的标本, 用黄金喷镀投影, 在 HU—12A 电子显微镜的扫描装置上观察和摄影。

1978 年 5 月中旬, 我们曾和广东省斗门县林业局一起, 在黄羊山林场和五四农场进行病毒治虫试验, 防治面积约 2000 亩。其中以五四农场的水厂岭为治虫效果统计点, 面积 2 亩, 海拔约 100 米, 马尾松树龄 8 年, 树冠高平均 2.5 米, 郁闭度 0.8, 马尾松毛虫 4—5 龄, 虫口密度每棵树 100—300 头。病毒材料为 1977 年秋保存于 50% 甘油中的死虫尸, 每亩用量为 350 克湿品, 在 10,000 转/分钟的组织捣碎机中匀浆 3 分钟, 双层纱布过滤, 然后加足 50 公斤水稀释, 于 5 月 13 日下午在试验点喷雾。和试验区相距约 300 米的另一山头为对照区, 条件与试验区相当。在两区中各设五棵标准树, 定期检查松毛虫死亡情况。

测定马尾松毛虫质型多角体病毒对高等动物的安全性, 是用 Van der Geest (1968) 法^[48]经蔗糖液分离提纯的多角体, 供试动物用体重 250 克以上的大白鼠和 650 克以上的家兔, 每个剂量作两个重复, 另设两组为对照, 逐日观察有无异常反应。

(二) 观察研究结果

1. 症状及多角体、病毒粒子形态及其超微结构

幼虫感病后, 食欲不振, 行动迟缓, 继而停食, 体躯略缩小, 腹大尾尖, 体毛显得较长, 有的病虫体躯向腹面弯曲。病虫体色基本不变, 一般有拉稀现象, 肛门外常常沾着白色粪便 (图版 I .4), 从肛门排出含有多角体的粘液, 幼虫死亡前胸肢仍可微动。由于附肢无附着能力, 病虫多跌落地下。死亡后, 皮肤仍坚韧不破, 病虫体内各器官仍清晰可辨, 色泽基本不变, 但脂肪逐渐减少。

感染的器官为消化道的中肠。健虫与病虫的消化道形状显著不同 (图版 I .5,6)。病虫的前肠往往充满咬碎的松针小粒, 其长度与口径均比健虫的显著长大, 而中肠则显著缩短, 约为健虫中肠长度 1/4, 有的缩短后略为膨大, 中肠上皮组织常有局部溃疡。后肠长度一般与健虫的相差不大, 肠腔内常有由一层胶粘物质所包裹的松针粒。组织切片观察, 病虫的中肠上皮细胞变长, 柱形细胞层出现许多纵列宽缝, 细胞核、细胞端部及细胞纹状缘崩解。细胞质有多角体, 近细胞端部的多角体尤为密集, 并进入中肠肠腔 (图版 I .7)。用 Hamm 染色法染色的标本, 多角体着色深红, 与其他组织及细胞着色明显有别。病虫中肠的超薄切片在电子显微镜下, 可见细胞质中散布的病毒粒子, 包埋的多角体中 (图版 I .8)。

多角体涂片经热处理后易为溴酚兰染色,为深蓝色,极易与其他组织区别,多角体也易为Giemsa染料染成深蓝色,昆虫核型多角体无此染色反应。在光学显微镜或电镜下,多角体呈典型的六角形(图版Ⅰ.9),直径0.5—3.0微米,也有的呈球形或卵形,少数呈不规则形,球形的一般直径较小,有的病虫以典型多角体为主,有的却以卵形为主。多角体不溶于水,但浸在水中过久(半年以上)会出现蚀刻,0.03M的碳酸钠水溶液可溶解多角体,在27°C左右的条件下,约经30分钟即可部分溶解,但有部分多角体经1%NaOH处理1小时仍未完全溶解。一般说来,多角体保存的时间越长,溶解的时间越长。溶解程度不同的多角体,形状也不同,其表面可溶成许多小洞或较大的洞而至溶去近半个而成一个大洞(图版Ⅰ.10,11)。如溶解时间较长,可见其中病毒粒子,大部分分离出来(图版Ⅰ.12)。

多角体包含许多病毒粒子。多角体的蛋白质晶体点阵是由点型排列而成,连成行列,行与行之间的距离约40—50 Å组成点阵行列的点直径约20—25 Å。(图版Ⅰ.13),

从超薄切片和碳酸钠溶解磷钨酸负染的标本中,都可见病毒粒子由两部分构成,即电子密集的核心及电子较稀的被壳(图版Ⅰ.14)。

病毒粒子直径为30—50毫微米。超薄切片标本中病毒粒子呈圆形、椭圆形、五边或六边形,被壳的周缘有五个、六个或更多的刺突(图版Ⅰ.15)。核心的直径是252 Å至546 Å,壳体的宽度是40 Å至67 Å。极少数病毒粒子的中央有空隙。

在多角体的超薄切片中,可见到具有12个亚单位的病毒粒子(图版Ⅰ.14),也有具有几根如上述的刺状突。还有个别病毒粒子从一个顶角伸出“尾”突,其长度约与粒子直径相等,比正常的刺状突长得多(图版Ⅰ.11左角)。核心与壳体之间偶见为一层电子较稀的环所分离。

2. 在松林喷施病毒的治虫效果

在松林中喷施病毒,连续几天遇上小阵雨,但效果仍好。经3天后松毛虫开始死亡。前期死亡的马尾松毛虫,多有细菌并发症,细菌感染往往占优势,死虫组织液化;其后病虫中呈现典型的质型多角体病症者渐增,达到较高的死亡率(表4)。病虫大多死于幼虫期,有的死于蛹期。在处理区附近松林里也发现有质型多角体感染的马尾松毛虫。

表4 马尾松毛虫CPV林间应用效果(广东省斗门县,1978)

时间(天)	死 亡 率 (%)	时间(天)	死 亡 率 %		
	施 病 毒 区	对 照 区	施 病 毒 区	对 照 区	
3	45	1.3	8	79.1	28
5	60	2.2	10	92	39.1

3. 病毒对哺乳动物的安全性测定

经提纯的马尾松毛虫质型多角体病毒的多角体对哺乳动物的毒性试验结果见表5

表5 马尾松毛虫CPV对哺乳动物的毒性测定(广州,1980)

动 物	剂 量	给 药 方 法	观 察 时 间 (天)	效 应
大 白 鼠	20,000多角体/克	口 服	21	正 常
	100,000多角体/克	口 服	21	正 常
	对 照	—	21	正 常

