

长须刺蛾核多角体病毒的分离、鉴定和毒力测定

陈纪文 杨名征 刘 勋

(广西柳州地区林科所)

梁东瑞 胡远扬 蔡毓能 何华钧

(武汉大学病毒研究所)

长须刺蛾(*Hyphorma minax* W.)属鳞翅目刺蛾科。是油桐的主要害虫之一。另外,还危害茶和樱花。分布于华北、浙江、江西、湖南、贵州、四川、广西、云南等地。在广西一年发生2代,老熟幼虫于土中结茧越冬,幼虫一般6—8龄。

1981—1983年柳州地区连年发生长须刺蛾幼虫大量自然罹病死亡,经分离鉴定是被长须刺蛾核型多角体病毒(Hm NPV)侵染所致。为了研究该病毒用于生防的可能性,我们对病毒的形态、组织病理、毒力和增殖等方面进行了研究,现将结果报道如下。

材 料 和 方 法

1. 供试幼虫: 采自林间的各龄健康长须刺蛾幼虫。

2. 多角体病毒: 从自然罹病死亡的长须刺蛾幼虫尸上分离获得。

3. 病毒的分离: 将病虫研碎,过滤去渣,用500—3,500rpm反复差速离心获得初提病毒,再经蔗糖梯度离心获得纯净的多角体病毒,加浓度为1000u的青霉素和链霉素处理,置冰箱保存。测定多角体含量。

将感病幼虫分期取样,制组织切片。镜检。

4. 病毒的增殖: 将病毒悬液分别添食感染各龄幼虫。分龄采收病虫。虫尸经差速离心得多角体粗提物,将4—6%乳糖按1:10的比例

加入粗提物中充分搅拌后,缓缓加入4倍量丙酮,边加入边搅拌20—30分钟,静置10分钟,用2000rpm离心20分钟,沉淀物再加适量丙酮后离心,如此重复2—3次得灰白色病毒。

5. 毒力测定: 将HmNPV分别稀释成8.3、 8.3×10 、 8.3×10^2 、 8.3×10^3 、 8.3×10^4 、 8.3×10^5 PIB/ml等6个浓度,按常规方法添食感染3龄幼虫,48小时更换新叶,每组25头,重复3次,10天终止。逐日记录温湿度,病征、病死虫数。并计算出 LD_{50} 、 LD_{90} 、 LD_{75} 和 LD_{95} 及其95%置信界限。

实 验 结 果

将自然罹病死亡幼虫电镜检查,发现含有大量多角体(PIB),将PIB重新感染健康幼虫,致使发病,症状与自然罹病症状相同,而且从病虫中分离到同样的PIB,表明PIB是引起幼虫罹病死亡的病原体。

(一) 感染病毒病征

幼虫感染病毒后,经3—4天体色失绿变黄,表皮失去光泽,上颚由红变为暗红,不食不动,不时全身痉挛,此时幼虫的部分枝刺及部分表皮变为灰褐色,并在一天内扩散至整体;濒死幼虫腹部两侧及气门下线之间常有水泡状物,

本工作承刘年翠教授指导并审阅本文。孙爱珍、谭光琴参加部分工作。刺蛾承中国科学院动物研究所蔡荣权同志鉴定。特表谢意。

流出粘液于叶子上。死亡幼虫体内组织液化，表皮脆弱，体液暗褐色或近酱色，无臭，稍有腥味。在林间，罹病幼虫大部分离群，爬向高处叶子正面不食不动，用尾足钳住枝叶倒挂死亡(图1)。

（二）病毒形态

观察镜检长须刺蛾核型多角体病毒包涵体大部分呈多边形，也有方形或长方形，大小为0.6—2 μ m（图2），病毒粒子为杆状，大小约为

125 × 410nm（图3），属单粒包埋型(SNPV)。

（三）组织病理

感病幼虫组织切片，可见中肠上皮，脂肪体、马氏管及体壁真皮等细胞被病毒侵染，细胞核发生明显病变，有的细胞核破裂释放大量多角体(图5、6)。

（四）毒力测定

在日平均气温 30.4℃，相对湿度 71% 的条件下，6 种不同浓度的病毒悬液对 3 龄幼虫添



图1 长须刺蛾幼虫被 NPV 感染倒挂死亡
图2 长须刺蛾 NPV 包涵体, ×3000
图3 长须刺蛾 NPV 部分碱解后电镜投影, 示包涵体中含多个病毒粒子, ×15000
图4 长须刺蛾 NPV 超薄切片, 示 NPV 为单粒包埋型、病毒粒子杆状, 核衣壳外被囊膜, ×75000
图5 被长须刺蛾 NPV 感染的病虫脂肪体。
图6 被长须刺蛾 NPV 感染的病虫马氏管。

食感染 10 天终止,幼虫死亡情况如表 1。罹病

表 1 六种浓度的病毒悬液感染 3 龄幼虫的死亡率

浓 度 (PIB/ml)	试虫头数	死亡头数	死亡率 (%)	校正死亡率 (%)
8.3	74	10	13.51	7.00
8.3×10	76	26	34.21	29.24
8.3×10^2	75	39	52.00	48.37
8.3×10^3	75	56	74.67	72.75
8.3×10^4	74	64	86.64	85.47
8.3×10^5	78	72	92.31	91.73
对 照	128	9	7.03	

幼虫第四天开始死亡,6—7 天达死亡高峰。回归直线方程为 $y = 3.22 + 0.57x$, 其函数图象如图 7。

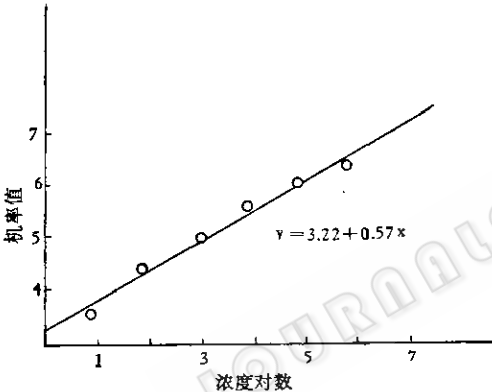


图 7 迴归方程函数图

根据回归方程推算 LD_{30} 、 LD_{50} 、 LD_{75} 及 LD_{95} 所需病毒浓度及 95% 置信限如表 2。

表 2 不同死亡率所需浓度及置信限

死亡率	浓 度 (PIB/ml)	95%置信限	
		上 限	下 限
LD_{30}	1.62×10^2	3.25×10^2	0.8×10^2
LD_{50}	1.33×10^3	2.33×10^3	7.6×10^2
LD_{75}	2.0×10^4	3.8×10^4	1.04×10^4
LD_{95}	1.0×10^5	4.3×10^5	2.3×10^5

从表 2 看出, LD_{50} 的病毒浓度为 1.33×10^3 PIB/ml, 上、下置信限分别为 2.33×10^3 与 7.6×10^2 PIB/ml, 说明其 LD_{50} 的范围在 7.6×10^2 — 2.33×10^3 之间, 但接近 1.33×10^3 PIB/

ml 的机率值稍偏高一些。随着病毒浓度加大。幼虫死亡率亦增高, 如 LD_{95} 的病毒浓度则达 1.0×10^5 PIB/ml。

同一病毒浓度对不同龄幼虫的感染如表 3。

表 3 病毒浓度为 8.3×10^3 PIB/ml 对不同龄幼虫的感染试验结果

虫龄	试虫头数	死亡头数	死亡率 (%)	校正死亡率 (%)
1	51	46	90.2	89.5
2	50	46	92.0	91.4
3	50	48	96.0	95.7
4	53	53	100	100
5	52	42	84.6	83.4
6	51	37	72.5	70.4
7	50	26	52.0	48.4
对照	128	9	7.0	

由表 3 可见, 8.3×10^3 PIB/ml 对 1—4 龄幼虫有较高的致病率, 始死时间早, 死亡高峰来得快; 对 5—7 龄幼虫随虫龄的增加, 死亡率相应有所降低, 始死时间较晚。

(五) 病毒的增殖

以 1×10^7 PIB/ml 添食感染不同虫龄的幼虫, 其多角体含量如表 4。

表 4 不同虫龄多角体增殖量测定结果

虫龄	PIB 含量 (mg/头)	PIB 含量 (个/mg)	PIB 含量 (个/头)
4	0.416	1.402×10^8	5.88×10^7
5	2.500	2.9×10^8	7.6×10^8
7—8	8.150	2.6×10^8	21.2×10^8

由表 4 可见, 随着虫龄的增大, 多角体含量迅速增加, 5 龄幼虫 PIB 含量是 4 龄幼虫的 1.29 倍, 7—8 龄 PIB 含量是 4 龄的 36 倍, 是 5 龄的 2.79 倍。因此, 病毒大量增殖, 宜在 5 龄期进行添食感染至 7—8 龄采收病死虫获得的病毒量最多。

小 结

长须刺蛾核多角体病毒是我国首次分离获得的一种鳞翅目昆虫病毒。电镜下, 多角体大

部分呈多边形,大小 $0.6-2\mu\text{m}$,病毒粒子杆状,大小约为 $125 \times 419\text{nm}$,为单粒包埋型。这种病毒对长须刺蛾 3 龄幼虫的 LD_{50} 为 $1.33 \times 10^3\text{PIB/ml}$ 。用 $8.3 \times 10^3\text{PIB/ml}$ 对 1—5 龄幼虫进行感染,其杀虫率在 80% 以上。在幼虫的

5 龄期添食感染,病毒的增殖量最高,每头多角体含量可达 7.6×10^8 以上。相当于 7—8 龄病死虫 65 头提取的病毒,可达 95% 以上的杀虫率。因此,研究和利用这种病毒制成病毒杀虫剂防治长须刺蛾害虫,将是一条新的途径。