

# 枣尺蠖核型多角体病毒研究初报

张兆义

(山东省林业科学研究所, 济南)

刑同宣

(山东省无棣县科协)

枣尺蠖 (*Succra jujuba* Chu) 俗名枣步曲、弓腰虫。属鳞翅目、尺蛾科。是我国北方晋、冀、鲁、豫等省枣树的主要食叶害虫。从枣树萌芽期开始幼虫即食害嫩芽、嫩叶,吐蕾后啃食花蕾,大发生年常将枣树吃秃,造成枣实减产,甚至绝产。

1979年春,我们从无棣县水湾镇枣粮间作林采到枣尺蠖幼虫的自然病死虫,经分离鉴定,其病原为一种核型多角体病毒,并对其形态、毒力和增殖方法进行了初步研究。

## 材料和方法

### (一) 病原鉴定

1. 病原: 1979年春采集的病死虫,经回接获得新鲜死虫体。

2. 症状观察: 采集枣尺蠖健康幼虫,饲以病死虫浸提液,置养虫笼饲养,观察发病死亡症状。

3. 病原初检: 取病死虫体剪断,在滴有蒸馏水的载玻片上轻轻研磨,加盖盖玻片,置光学显微镜下检查。

4. 病毒多角体的分离提纯: 将死虫剪碎,加适量无菌水浸泡24小时,搅拌,双层纱布过

滤,滤液经500rpm离心5分钟,取上清液3000rpm离心30分钟,取沉淀加适量无菌水振摇悬浮,反复以3000rpm离心30分钟清洗3—5次,至上清液无色透明,即可得到初步纯化的病毒多角体。

5. 电镜样品的制备: 病毒多角体的透射电镜样品,可直接将纯化稀释的多角体悬液滴于载有福蒙瓦尔膜的铜网上,滤纸吸干,双蒸水浸洗3次,吸干即可。

多角体的扫描电镜样品,是将纯化的多角体悬液滴于扫描电镜样品托上,晾干,黄金电热真空喷涂。

多角体降解是在载有福蒙瓦尔膜的铜网上进行的。多角体铜网点样后,滤纸吸干,吸管滴加1滴1% NaOH碱液,使多角体迅速碱解释出病毒粒子。碱解时间控制在15秒至1分钟,滴加1滴1%冰醋酸中和碱液,中止碱解,双蒸水浸洗3次,滤纸吸干,PTA负染2分钟,吸干,浸洗,干燥。

枣尺蠖幼虫染病组织(包括:上皮、脂肪体、中肠、马氏管和气管基质)的超薄切片,采用

参加该项工作的还有傅美英、吴兴梅、孙效新、张东荣等同志。

戊二醛、铬酸组织双固定,酒精系列脱水,环氧树脂浸透包埋,切片、载网,PTA 负染。

## (二) 毒力测试

1. 室内毒力试验: (1) 涂卵: 粗提病毒多角体用血球计数板计数, 加无菌水配制 30 亿 PIB/ml 病毒悬液, 毛笔沾涂枣尺蠖卵块表面, 置培养皿保湿。幼虫孵化后用新鲜枣叶饲喂, 每天记录发病死亡情况。(2) 幼虫饲毒: 枣叶或白榆叶浸沾不同浓度的病毒悬液, 晾干, 置直径 20cm 养虫缸, 接入一定数量的幼虫, 24 小时后换新鲜枝叶, 记录逐日死亡数。

### 2. 田间毒力试验

每隔 20m 选择一株标准树, 喷洒病毒悬液及化学农药, 喷后在同一方位选枝套笼, 接入同龄幼虫, 每天记录发病死亡情况。另在百米之外选择标准树罩笼接虫做对照。

## (三) 病毒的增殖

用 100 倍无菌水浸泡病死虫, 以匀浆器匀浆 10 分钟, 双层纱布过滤, 滤液中加入 500u/ml 青链霉素抑菌剂, 采用以下 4 种方法增殖病毒。

1. 在容器内增殖: 将浸沾病毒悬液的枣树枝叶放入罐头瓶中, 接入枣尺蠖幼虫 30—50 条, 每天更换新叶, 及时采收染病死虫。

2. 在纱笼内增殖: 选择未结枣幼树, 喷洒病毒悬液, 罩以直径 30cm、长 100cm、两端有布口的塑料纱笼, 每笼接虫 100 条左右, 树叶吃光, 再补充新叶。幼虫病死干燥后一次采收。

3. 在田间增殖: 利用枣尺蠖幼虫取食白榆叶的特性, 选择密集成片白榆幼树, 放养适量枣尺蠖幼虫, 喷洒病毒悬液, 第 3 天清理落地死虫, 待幼虫病死干燥后一次采收。

4. 在室内增殖: 设饲毒室、增殖室各一间。饲毒室内壁围 50cm 高的塑料薄膜, 以防幼虫外逃, 地面铺报纸, 将浸过病毒悬液的枣树枝叶均匀撒在报纸上, 接虫。幼虫取食 24 小时后, 连同枝叶移入增殖室。饲毒室可另接新虫饲毒。增殖室要通风干燥, 室内悬挂塑料窗纱接连地面, 任染病幼虫上爬待死。移入的饲毒幼虫均匀撒在增殖室地面, 并补充适量新鲜枣叶。死虫干燥后一次采收。

## 结 果

### (一) 病原鉴定

1. 感病症状: 幼虫取食病毒后第 3 天食量明显下降, 纷纷爬向枝梢顶端, 继而行动迟缓, 身体肿胀, 体色变灰白或淡黄, 未对腹足和臀足抱握小枝, 身体倒垂(图 1)。幼虫死后, 体内组织液化, 体壁脆弱, 极易断裂, 流出灰白色浓液。多数染病幼虫悬树死亡, 自然干瘪, 少数老熟幼虫染病后落地, 身体皱缩变黑, 死于前蛹期。

2. 病毒形态: 在光学显微镜下可见大量折光性很强、大小一致的近圆形颗粒, 即为病毒多角体。多角体的电镜图像近似正方形, 角钝, 无特定表面结构(图 2、3)。多角体直径 0.7—1.8 $\mu$ m, 平均 1.4 $\mu$ m。

病毒粒子直杆状, 两端钝圆, 外被双层外膜, 大小为 88.7  $\times$  321.2nm, 在多角体内单粒包埋, 呈不规则排列(图 4—6)。参照 ICTN 病毒分类与命名系统, 该病毒应属于杆状病毒科(Baculoviridae), 杆状病毒属(Baculovirus), A 亚组, 定名为枣尺蠖核型多角体病毒 *Sucra jujuba Nuclear Polyhedrosis Virus*, 简称 Sj NPV。

### (二) 毒力测试

1. 室内毒力试验: 用毛笔沾取每毫升 3.3 或 30 亿病毒多角体悬液及 100 倍病死虫浸泡液, 涂抹于枣尺蠖卵块表面, 涂抹后 3—11 天幼虫孵化, 初孵幼虫致病死亡率在 91.6—100% (见表 1)。

幼虫饲毒: 1981—1982 年, 以  $5 \times 10^3$ — $5 \times 10^7$  PIB/ml 病毒悬液和 100—1600 倍病死虫浸泡液沾枝饲喂 2—3 龄幼虫, 其死亡率均在 85—100%。同浓度病毒液, 2 龄较 3 龄幼虫更为敏感(见表 2)。死亡高峰出现在饲毒后的第 7—9 天。由此可见该种病毒对枣尺蠖幼龄幼虫具有较高的毒力。

### 2. 田间毒力试验

1982—1984 年先后在无棣县进行过 4 次田间毒力试验, 其中 1982 和 1983 年 5 月两组试验所用病毒为 1981 年增殖品, 其余两组为当年新增殖病毒。结果见表 3。



图1 感病死虫  
图2 枣尺蠖 PIB 透射电镜图,  $10^4\times$   
图3 枣尺蠖 PIB 扫描电镜图,  $5\times 10^3$   
图4 枣尺蠖多角体碱解释放的杆状病毒粒子,  $2\times 10^4$   
图5 正在脱去外膜的病毒粒子,  $105\times 10^3$   
图6 枣尺蠖多角体超薄切片(箭头示细胞核膜),  $2\times 10^4$

表1 病毒涂卵试验结果

(1981.4)

卵 块 号	病毒浓度*	卵粒数(个)	幼虫死亡(个)	死亡率(%)	校正死亡率(%)
1	3.3 亿 (PIB/ml)	90	83	92.2	91.6
2	30	77	75	97.9	97.6
3	30	111	111	100	100
4	30	45	45	100	100
5	100 倍	55	55	100	100
6	100	41	40	97.5	97.1
7	对照	131	18	13.7	

\* 病毒悬液为 1979 年野外采集的自然病死虫,于 1981 年 4 月离心制备。

表2 室内毒力试验

饲毒时间	病毒浓度	虫 龄	虫 数	死亡数	死亡率 %	校正死亡率 %
1981年5月14日	$5 \times 10^3$ (PIB/ml)	3	30	26	86.7	
	$5 \times 10^4$		30	27	90	
	$5 \times 10^5$		30	29	96.7	
	$5 \times 10^6$		30	28	93.3	
	$5 \times 10^7$		30	28	93.3	
	对照		30	0	0	
1981年5月14日	$5 \times 10^3$ (PIB/ml)	2	20	20	100	
	$5 \times 10^4$		20	19	95	
	$5 \times 10^5$		20	17	85	
	$5 \times 10^6$		20	19	95	
	$5 \times 10^7$		20	20	100	
	对照		20	0	0	
1982年5月	1600 (倍)	2	40	38	95	94.3
	800		40	37	92.5	91.4
	400		40	39	97.5	97.1
	200		40	40	100	100
	100		40	40	100	100
	对照		40	5	12.5	

表3 田间毒力试验

时 间	地 点	病毒或药剂浓度 (倍)	病毒含量 (PIB/ml)	虫 龄	虫 数	死亡数	死亡率 %	校正死亡率 %
1982年5月	韩王大队	100		3	100	99	99	98.9
		200			100	100	100	100
		400			100	97	97	96.7
		800			100	80	80	77.8
		1600			100	96	96	95.5
		对照			50	5	10	
1983年5月	王昌大队	100	$1.6 \times 10^7$	2—3	20	16	80	
		200	$8 \times 10^6$		20	14	70	
		400	$4 \times 10^6$		20	19	95	
		800	$2 \times 10^6$		20	13	65	
		200+DDV 3000	$8 \times 10^6$		40	33	82.5	
		DDV3000			20	13	65	
		对照			40	0	0	
1983年6月	王昌大队	100	$4.8 \times 10^7$	3—4	21	21	100	
		200	$2.4 \times 10^7$		20	13	65	
		400	$1.2 \times 10^7$		20	18	90	
		800	$6 \times 10^6$		20	20	100	
		1600	$3 \times 10^6$		20	20	100	
		对照			20	0	0	
1984年6月	后牛大队	$2 \times 10$	$5 \times 10^8$	4—5	100	87	87	
		$2 \times 10^2$	$5 \times 10^7$		100	73	73	
		$2 \times 10^3$	$5 \times 10^6$		100	84	84	
		$2 \times 10^4$	$5 \times 10^5$		100	88	88	
		$2 \times 10^5$	$5 \times 10^4$		100	45	45	
		对照			100	0	0	

试验表明,该病毒对 2—5 龄枣尺蠖幼虫致病力都很强,病死虫浸提液 100—1600 倍或每毫升病毒液含多角体  $5 \times 10^4$ — $5 \times 10^8$ , 杀虫效果均在 80% 以上,甚至高达 100%,比 3000 倍 DDV 的毒杀力高得多。当年新增殖的病毒明显较往年保存的病毒毒力高,贮藏时间越长,毒力越低。

### (三) 病毒增殖

先后采用容器、纱笼、田间和室内 4 种方法增殖病毒。容器法较省食料,占空间小,病死虫收率高,适用小小规模室内生产。但容器内湿度大,幼虫生存条件恶劣,发病死亡快,并易污

染杂菌,致病毒质量差、产量低。纱笼法可保证幼虫的食料和生活空间,生产的病毒质量高,但使用纱笼较多,每笼接虫量有限,生产规模受到限制。田间增殖的优点是不需要任何设备,把病毒的增殖和治虫融为一体,方法简单,易于大规模生产,缺点是在露天条件下,受到鸟类和食虫昆虫等天敌的捕食及风雨侵袭,用以增殖病毒的活虫和染病死虫损失量大,病毒的最终收获量较小。室内增殖法克服了以上三种方法的缺点,既适用于大规模生产,也保证了病毒的质量,空间大、设备简单、操作简便,易为群众接受,是一种较好的增殖病毒的方法。