

斜纹夜蛾 (*Prodenia litura* Fab.) 的 核多角体病的研究

戴冠群 杨齐云* 刘兴荔* 石木标

(植保系)

提 要

本文通过近几年来对感染剂量、宿主龄期、饲料、温度等因素的室内试验研究,以及利用乙醚麻醉喂毒宿主进行病毒制剂生产的探讨,结果表明,要达到有效的生物防治害虫的效果,必须掌握在幼虫低龄期(即3龄期前)进行喷毒,利用乙醚麻醉宿主可以大大缩短潜伏期,提高病毒制剂的产量。

斜纹夜蛾 (*Prodenia litura* Fab.) 是一种杂食性害虫,在我省曾为害多种作物,它的核多角体病害,自我院于六十年代初期首次作了报道以后^[1],北京动物研究所^[2]、中山大学^[3]、广州市微生物研究所、武汉病毒研究所^[4]相继作了试验和研究。DDT及666不能用于蔬菜、水果、茶叶等作物上,1974年国务院对此作了指示。为了贯彻这个指示精神,所以我们试图将此病毒病用于害虫的防治上,对此种病毒病再作了一些试验和观察。现将我们的工作简报如下。

材 料 和 方 法

病毒毒株

斜纹夜蛾核多角体病毒系华南农学院微生物教研室从广州郊区罹病之斜纹夜蛾幼虫中分离得之。

病毒繁殖

(1) 饲毒感染法

用每毫升约含 10^7 — 10^8 左右多角体(NPB)的死虫组织液,涂抹饲料叶片上,稍干

本文电镜照片承本院中心实验室协助,特此致谢。

* 广西农学院植保系教师。

后用以饲喂健康的3—4龄斜纹夜蛾幼虫,1—2天后改用清洁叶片,并经常检查发病情况及观察其病症,随死随收,以免死虫腐烂而无法收集。虫尸体液要经涂片染色在光学显微镜下检查有无病毒多角体。

(2) 乙醚麻醉法

将斜纹夜蛾幼虫饲养至五龄初期,用含 10^7-10^8 NPB/ml的浓度浸叶后饲喂,把幼虫收集于广口瓶中,一个500ml的广口瓶滴入0.1—0.2ml含有氯仿的乙醚麻醉48小时后,即收集虫体并干燥保存。

病毒保存

(1) 将染病死虫直接装入干净的玻璃小瓶加盖后放于4℃冰箱保存。

(2) 将染病死虫盛于玻璃器皿中,在干燥器内进行干燥,后继续在干燥器内保存,或密封放于冰箱保存。

(3) 用适量碳酸钙与死虫尸体混合研磨干燥保存。

生物测定

将染病死虫磨碎,用血球计数器计数,稀释至所需浓度,用毛笔涂布于饲料叶片表背两面,湿润为止,晾干后恒温饲喂试验的各龄幼虫,24小时后换无毒鲜叶,七天内逐日记录死亡虫数。死虫要抽样检查,是否属于病毒致死,并求出致死中浓度(LC_{50})。用同样处理方法,在不同温度,相同的病毒浓度的条件下测定幼虫对病毒的敏感性和感染剂量对宿主的影响,以及多角体病毒复制与宿主饲料的关系。

实 验 结 果

一、斜纹夜蛾核多角体的形态及病毒病的特征

斜纹夜蛾病毒多角体电镜观察大多呈六角形,也有不规则形状的;大小不一,平均直径约为2.2微米(图1)。

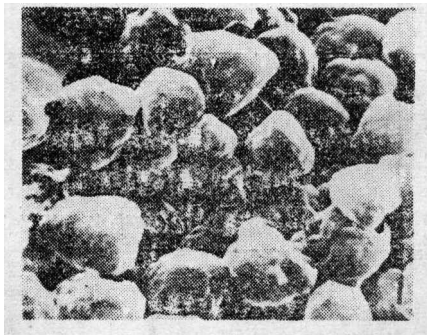


图1 斜纹夜蛾核型多角体($\times 10000$)

金旋转投影, JSM—25S扫描电镜照片

已进入五龄。染病幼虫腹壁呈现乳白色或粉红色,随着病情的进展出现呕吐和排出粘液状粪便,以后幼虫逐渐进入昏迷状态,不食不动,腹壁灰白带红更为显著,很快便进入死亡阶段。死亡后的幼虫有时可在体节之间有一乳白色斑。病死虫常倒挂在植物和养虫

染病幼虫最大特点是发育缓慢,体色常在感病三天后变粉红或灰白。三龄以上的幼虫感染核多角体病毒后,一般2—3天就出现食欲减退,行动迟缓,呆滞,与对照比较,其发育缓慢,虫体细小。1978年4月29日我们选取虫体大小一致的四龄斜纹夜蛾幼虫各20头分组饲养,喂毒组使用 5.4×10^7 /ml多角体浓度,重复三次,另设一组对照,喂毒后四天进行称重,处理组20头平均体重为4.6克,幼虫开始陆续死亡。而对照组20头平均体重为7.2克,并

器材上,一旦死亡,表皮极脆弱,微触即破或自行破裂,流出乳白色的不发臭的体液。此时涂片观察,高倍镜下可看到折光性较强的多角体。用什维左娃法染色,在油镜下观察可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,其它组织颗粒则被染成绿色,形成明显的对照。

染病幼虫还有严重的残杀现象,同时垂死的病虫会把死虫吃掉,所以在饲毒感染过程中要随死随收。

二、斜纹夜蛾核多角体病毒的室内试验

为了给斜纹夜蛾核多角体病毒的制剂生产和大田应用提供必要的的数据,1975—1977年我们在室内进行了包括感染剂量、宿主龄期和饲料以及温度等因素的试验。

(一) 感染剂量对宿主的影响

将NPB配制一定浓度的悬浮液,然后均匀地涂布到饲料叶片表面,供试幼虫为3、4龄虫,按试验浓度将虫分成几组,然后分别用定量的不同浓度的带毒叶片感染。候吃完带病叶片后更换新饲料,待宿主死亡后分别逐日收集各组的虫尸,然后进行涂片检查。结果表明:在一定范围内,多角体浓度增大则宿主幼虫的感染率与死亡率也随之增高。见表1:

表1 不同浓度对3—4龄幼虫毒力比较

处 理 浓 度	供试虫数	虫 龄	死亡率(%)	化蛹率(%)	备 注
$10.1 \times 10^7/\text{ml}$	16	4	81.25	12.75	单 养
$5.4 \times 10^7/\text{ml}$	15	4	73.33	26.07	"
$2.8 \times 10^7/\text{ml}$	16	4	75.00	25.00	"
对 照	20	4	20.00	80.00	" (细菌致死)
$4.5 \times 10^6/\text{ml}$	20	4	85.00	15.00	四头一瓶
$4.5 \times 10^7/\text{ml}$	18	4	94.44	5.56	"
对 照	11	4	0	100.00	"
$4.5 \times 10^6/\text{ml}$	36	3	85.85	4.15	四头一瓶
$4.5 \times 10^7/\text{ml}$	103	3	99.03	0.97	"
$1.64 \times 10^8/\text{ml}$	27	3	100.00	0	"
$5.76 \times 10^8/\text{ml}$	15	3	100.00	0	"
对 照	20	3	20.00	80.00	" (感染多角体致死)

(二) 宿主龄期与其对病毒敏感性的关系

将不同龄期幼虫用同一浓度的带毒叶片进行饲喂感染,感染后更换新鲜饲料,试验结果表明:不同虫龄对病毒的敏感性是不相同的,一般1—3龄虫最为敏感,4龄以上致死缓慢(见表2)。因此,我们认为在大田防治工作中应当选择在幼虫低龄期(即3龄前)进行,而在人工感染幼虫进行病毒制剂生产时,则可采用虫龄较大的幼虫饲毒,由于此时期虽敏感性较差,致死缓慢,但病毒收获量较多。

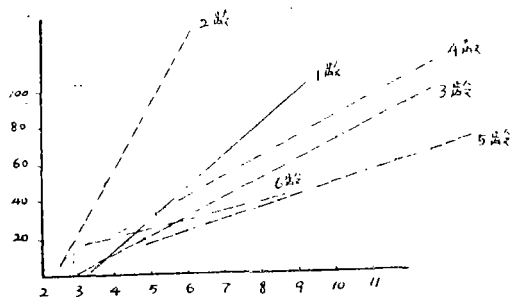
表2 斜纹夜蛾1—6龄幼虫对多角体病毒敏感试验

1978, 7, 2. 28—30°C

处 理	项 目	供试 虫数 (头)	虫 龄	死 亡 进 度 (%)								化蛹率	
				2天	3天	4天	5天	6天	7天	8天	9天	10天	11天
1.07 × 10 ⁸ /ml	202	1		0.45	17.82	40.10	57.43	96.53	96.53	98.51	100.00		
	10	2		20.00	60.00	70.00	70.00	80.00	90.00	100.00			
	30	3			6.67	16.67	63.33	73.33	76.67	83.33	86.67		3.33
	42	4			4.76	23.81	57.14	92.86					7.14
	50	5		4.00	6.00	22	46	64.00	66.00				34.00
	19	6		10.53	15.79	21.05	31.57	36.84					63.16
2.14 × 10 ⁷ /ml	297	1		0.69	2.69	18.52	55.56	79.12	94.94	96.66	100.00		
	15	2	6.67	33.33	53.33	86.67	100.00						
	33	3		3.33	6.66	10.00	42.42	54.54	54.54	66.67	75.75	78.78	21.22
	77	4			6.5	25.97	50.65	75.32	79.22	80.52	87.01		12.99
	63	5				7.94	20.64	41.27	46.03			57.14	42.86
	23	6		17.39	17.39	26.09	30.44	34.79					66.21
对 照	73	4											100.00
	89	5											100.00
	30	6											10.000

由表2可以看出,在使用每毫升稀释液含多角体 2×10^7 — 10^8 的范围内,1—2龄幼虫最敏感,尤其2龄幼虫敏感度最大,死亡速度最快,通常死亡率均达100%。3—4龄幼虫次之,死亡率在80—90%之间,5—6龄幼虫抗性最强,5龄幼虫死亡率为57.14—66%,6龄幼虫死亡率仅达34.79—36.84%。

利用表2的数据进行 $1.07 \times 10^8 / \text{ml}$ 及 $2.14 \times 10^7 / \text{ml}$ 多角体浓度对1—6龄幼虫毒杀效果数理分析,得出相应的回归式,根据各回归式作图(图2),同样反映出1—2龄幼虫死亡快、死亡率高的特点。其中以2龄幼虫尤其敏感,这可能与2龄幼虫较为活跃,同时取食量较大,因此随着饲料进入体内的病毒较多,加上2龄幼虫的抗病力仍然较低,故



* 纵座标为死亡率 横座标为喂毒后天数

图2 斜纹夜蛾NPB对斜纹夜蛾各龄幼虫的毒效

表现2龄虫死亡快,死亡率也高。从图中可以看出,3—4龄幼虫对病毒的抵抗力加强了,但死亡率仍相当高;而5—6龄幼虫抗性最强,死亡率最低。5—6龄幼虫发育至预蛹期死亡的约占总死亡率10%左右,预蛹期没有死亡的幼虫通常均能正常化蛹,并羽化为成虫。羽化率在80%以上。羽化后的成虫能正常交尾产卵。我们观察了少数卵块,这些卵块均能正常孵出幼虫,发育也属正常。但其幼虫养至

4—5龄时相继出现死亡现象,经镜检为多角体病毒所致。由于通常是养至12天后才开始死亡,这是否由于养虫室污染了多角体所引起尚值得注意。如果是由于卵带毒所致,按理应在1—2龄时就造成大量死亡。病毒能够通过感染的幼虫传到下一代的报道也有,但从上述现象看来,有关带毒幼虫通过繁殖传代的可能性尚待进一步研究。

(三)核多角体病毒复制与宿主饲料的关系

选用不同饲料喂养的各龄纹纹夜蛾,经人工感染后从各组死虫中取样检查,将虫尸先行称重后磨碎稀释成一定倍数的悬浮液,用血球计数器测数后换算为每克死虫含多角体数来进行比较。试验结果表明,不同饲料对核多角体的产量没有明显的关系,但不以每克含多角体数量来作比较单位,而是以每头虫含多角体的平均数来比较,那么以芋叶作饲料的病毒产量较高。每克死虫含核多角体的数量有随虫龄增大而减少的趋势(见表3),这可能是高龄幼虫死亡后体内尚含有较多的饲料、排泄物及水分的原因。

表3 4—6龄幼虫取食不同饲料感染多角体的产量

项 目	4		5		6	
	茨 叶	芋 叶	茨 叶	芋 叶	茨 叶	芋 叶
平均每克死虫含量	1.30×10^{10}	1.31×10^{10}	8.72×10^9	7.96×10^9	5.75×10^9	6.72×10^9
变 幅	$5.6-36.5 \times 10^9$	$5.8-37.6 \times 10^9$	$4-15.6 \times 10^9$	$4-18.9 \times 10^9$	$4-68.8 \times 10^9$	$4.5-9.55 \times 10^9$
平均每头死虫产量	1.31×10^9	1.31×10^9	2.03×10^9	1.76×10^9	3.28×10^9	3.9×10^9
平均每头死虫重(克)	0.1	0.1	0.21	0.22	0.57	0.58
变 幅	0.04—0.15	0.08—0.15	0.15—0.22	0.17—0.30	0.49—0.83	0.4—0.83
观察虫数	9	8	7	10	14	13

(四)温度与病毒感染的关系

温度的高低与病毒感染潜伏期的长短是有关系的,在一定幅度内温度低则潜伏期长,温度高则潜伏期短。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。在22°C时致死中时(Lt_{50})为9.3天,而在30°C Lt_{50} 只有5天。在22°C条件下感病10天后只有60%死亡,其余均陆续化蛹;而在24°C、27°C、30°C情况下分别都在第10、9、8天100%死亡。

(五)病毒离心提纯与粗制品毒力的差别

根据我们试验的结果,病毒毒力的强弱与病毒是否经过离心提纯有关。1978年6月我们利用经过提纯的多角体和未经提纯的多角体粗制品作对比试验,供试虫龄为3龄,结果见表4。

从表4可见粗制品比纯品具有较高的毒力,同时饲毒后第2—4天便开始死亡,4—7天死亡率达到高峰,而纯品喂饲的死亡较迟。

表 4 NPB 纯品与粗制品毒力比较

项 目 使 用 浓 度	供试虫数	死 亡 率 (%)	化 蛹 率 (%)	死亡始期 (天)	死亡高峰期 (天)
纯NPB $2.78 \times 10^7/\text{ml}$	41	90.25	9.75	8	9—10
粗NPB $4.5 \times 10^7/\text{ml}$	102	99.20	0.80	2	4—7
粗NPB $4.5 \times 10^6/\text{ml}$	33	90.91	9.09	4	5—7

(六) 斜纹夜蛾核多角体抗腐败能力试验

斜纹夜蛾核多角体病毒其包含体在没有防腐的情况下,罹病虫尸收集后任其腐败发酵变臭,经半个月后镜检发现其包含体仍然保存得很好,而且毒力仍能保持在相当高的水平上。在常温干燥暴露保存一年后仍有很高的毒力(见表5)。

表 5 不同保存方法对毒力影响 (虫龄: 3 龄)

处 理 项 目	使 用 浓 度	供试虫数(头)	死亡率(%)	化蛹率(%)
干 燥 保 存	$4.5 \times 10^7/\text{ml}$	15	100	0
腐 败 发 酵	$4.6 \times 10^7/\text{ml}$	15	93.97	6.67

从试验中说明斜纹夜蛾核多角体病毒包含体对不良条件的抵抗能力是很强的,一般不容易被腐败细菌所分解,这种特性有利于在自然界中保存这种病毒,在条件适宜时得以重新造成害虫病毒病的感染和流行。

(七) 斜纹夜蛾核多角体病毒的收集

由于这种病毒有专一性,只能感染斜纹夜蛾,因此要收集这种病毒,目前主要通过活体繁殖的方法取得。这样就必需进行大量养虫,饲毒后收集罹病死亡的幼虫。在养虫方面可以分为群养和单头饲养,前者占用器材少,花费劳力也少。但群养至4龄后,尤其4—5龄时则出现严重的相互残杀现象,其死亡率高达40—60%,如果能很好地控制其小环境的湿度及光照,可以改善这种现象(一般相对湿度在75%左右,给予较弱的光照及充足的饲料,可以减少互相残杀的现象)。但是群养由于其密度大,排泄物及饲料中水分蒸发等原因,不易使湿度控制在较低的水平,虫与虫相互接触,拥挤的机会多,常常难以防止互相残杀的现象。而单头饲养花的工夫大,而且收效甚微,所以也不是理想的办法。

目前对于斜纹夜蛾核多角体病毒的离体组织培养方法尚不普遍,所以可以采用的收集方法就只有两个途径:(1)人工饲养幼虫,饲毒收集。(2)大田喷施病毒多角体后收集罹病死虫。

为了解决大量养虫时因互相残杀而减少收取率的问题,我们针对其在5龄中后期才出现严重残杀的现象,选择在5龄初期进行饲毒,喂毒后试用一种含氯仿的乙醚麻醉剂对幼虫进行麻醉,其方法如下:

(1) 待斜纹夜蛾饲养至5龄初期。

(2) 用含 10^7-10^8 NPB/ml的浓度浸叶后饲喂。

(3) 把经喂毒后的幼虫收集于广口瓶内, 每个500ml容积的广口瓶可容纳40—50头幼虫, 广口瓶壁事先垫好吸水纸。

(4) 每瓶滴入0.1—0.2ml麻醉剂, 立刻密闭瓶口, 此时幼虫在一分钟内全部被麻醉, 幼虫在被麻醉过程中会出现呕吐现象, 以后即进入昏迷状态。

(5) 把已麻醉的幼虫摇向瓶壁, 然后将瓶侧卧放置。

被麻醉的幼虫在24小时左右有复苏现象, 同时出现呕吐和排便情况, 检查其呕吐物及粪便都有多角体存在, 说明已中毒。少数幼虫在麻醉后24小时死去, 其死亡率为8—10%, 麻醉后48小时死亡率达80—90%, 72小时100%死亡。往常开放饲毒, 5龄幼虫以同样浓度喂毒后24小时是没有死亡的, 48小时死亡率为1—6%, 72小时死亡率为5—10%, 第六天死亡率为40—50%, 第七天死亡率为60%, 尚有40%左右化蛹。由此可见, 利用麻醉方法能够迅速、整齐、成批地收集到大量的死虫, 方法简单, 花工少, 可考虑应用。

高等动物中神经系统的调节作用能够在一定程度上抵抗入侵的病原, 减轻病情或延缓发病期的作用。但对昆虫进行麻醉, 却出现了缩短发病的潜伏期和提高死亡率的现象, 这是否可能与神经系统被麻醉后无法调节其体内的抵抗能力有关。

讨 论

利用斜纹夜蛾核多角体病毒防治害虫, 要达到有效的防治效果, 应选择在低龄幼虫期进行防治, 也就需要密切与害虫的预测预报相结合。在我国南方地区, 7—9月份气温较高, 而又是斜纹夜蛾危害最严重的时刻, 应用核多角体病毒防治这种害虫是值得考虑的。目前核多角体病毒杀虫效果较缓慢, 潜伏期长, 对其杀虫机理和环境条件的关系, 以及选育毒性高的毒株, 仍需深入一步研究。对于利用乙醚麻醉5龄幼虫来进行病毒制剂的制备, 既可缩短其潜伏期, 又可提高病毒制剂中多角体的数量, 此种简易的制备方法仍需进一步完善和探讨。

参 考 文 献

1. 戴冠群, 1973, 广州地区斜纹夜蛾的多角体病初步研究。《昆虫学报》, 16 (1): 89—90。
2. 黄冠辉、丁翠, 1975, 斜纹夜蛾多角体病毒的研究。《昆虫学报》, 18 (1): 17—24。
3. 中山大学生物系昆虫病毒研究组, 1976, 斜纹夜蛾核多角体病毒的初步研究。《中山大学报 (自然科学版)》, 1976 (3): 92—97。
4. 武汉病毒研究所昆虫病毒组, 1979, 斜纹夜蛾核型多角体病毒的研究。《微生物学通报》, 1979 (4): 1—3。

A Study on Nuclear Polyhedrosis from the Noctuid Moth *Prodenia litura* Fab.

Tai Guan—qun et al.

(Department of Plant Protection, South China Agricultural College
and Guangxi Agricultural College)

ABSTRACT

This paper is a report of the study of recent years on the preparation and isolation of NPB (Nuclear Polyhedral Bodies) from the noctuid moth *Prodenia litura* Fab. infested by polyhedrosis. With a view to increasing the production of NPB, such factors as the larval stage of the insect host, kind of feeding stuff, environmental temperature were studied. It was found that at the 3rd instar stage, if the insect host was treated with anaesthetic ether the incubation period was shortened and the yield of NPB was higher than the untreated ones.

It was also shown that young larvae of 1-3 instars of this insect host could be effectively controlled by spraying with the suspension of the virus. In addition, tests of the virulence of raw-virus suspension obtained from the reared larvae indicated that these suspensions were more effective than the purified ones.