

马尾松毛虫质型多角体病毒 替代宿主的研究

周小毛· 戴冠群

(植保系)

摘要 马尾松毛虫 (*Dendrolimus punctatus* Walker) 质型多角体病毒 (DpCPV) 能交叉感染粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*)、斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*)、亚洲玉米螟 (*Ostrinia furnacalis*)、大蜡螟 (*Galleria mellonella*)、菜青虫 (*Pieris rapae*) 等鳞翅目幼虫, 致病程度随昆虫种的不同而有较大差异, 米蛾 (*Corcyra cephalonica*) 幼虫则对 DpCPV 不敏感。DpCPV 对粉纹夜蛾幼虫的致死率可达 100%。从粉纹夜蛾幼虫中复制出来的病毒 (Tn-DpCPV) 对松毛虫 3~4 龄和 4~5 龄幼虫的 LC_{50} 分别为 1.73×10^5 和 3.06×10^6 CFU/mg 。在粉纹夜蛾幼虫中肠细胞中, 多角体的形成是以小块状结晶开始, 边包埋病毒粒子边相互聚合而成。

关键词 马尾松毛虫; 质型多角体病毒; 交叉感染; 形态建成; 毒力测定

马尾松毛虫 (*Dendrolimus punctatus* Walker) 是危害松树的大害虫, 其中寄生了一种质型多角体病毒 (Cytoplasmic polyhedrosis virus)^[1,2]。广东省林科所曾对 DpCPV 的形态、病理、毒力、林间应用及安全性试验等进行了一系列的研究, 表明该病毒是松毛虫综合治理中一种安全有效的措施^[3]。但室内大量生产该病毒的方法及工艺流程尚未得到解决, 因而难于在松毛虫综合治理中进一步推广应用。

目前增殖 CPV 的方法仍是接种自然种群, 该法易受季节的限制及气候、环境、宿主天敌和其它病原微生物寄生等因素的影响^[4,7]。但是, 利用 CPV 对鳞翅目昆虫具有高度的感染性和广泛的宿主范围这一特点来筛选其增殖的替代宿主, 建立易饲养、虫体大、病毒复制量高的室内敏感寄主的种群来生产 CPV 是可行的。陈昌洁等 (1990) 曾利用棉铃虫 (*Heliothis armigera*) 来增殖赤松毛虫 (*D. spectabilis*) CPV。

由于松毛虫毒毛对人体有害且未见该虫人工饲料配方的报道, 因此室内大规模饲养尚有困难。为了寻求 DpCPV 适宜的替代宿主及扩大此种病毒用于害虫生物防治的范围, 我们进行了 DpCPV 对粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*)、斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*)、大蜡螟 (*Galleria mellonella*)、亚洲玉米螟 (*Ostrinia furnacalis*)、菜青虫 (*Pieris rapae*) 及米蛾 (*Corcyra cephalonica*) 等鳞翅目昆虫的交叉感染试验, 同时对 DpCPV 在粉纹夜蛾幼虫中肠细胞中的形态建成及从粉纹夜蛾幼虫中复制出来的病毒 (简称 Tn-DpCPV), 对松毛虫幼虫的感染和毒力等进行了研究。

· 现在广东省农科院植保所工作
1992-06-25 收稿

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试病毒株来源 (1) DpCPV: 广东省林科所提供, 在马尾松毛虫体内增殖后, 差速离心提纯, 用蒸馏水配成 1×10^8 CPB/ml 的悬浮液, 放冰箱备用。

(2) Tn-DpCPV: 在粉纹夜蛾幼虫中复制所得 DpCPV。

1.1.2 供试昆虫来源 (1) 马尾松毛虫 (*Dendrolimus punctatus*): 采自广州市沙河龙眼洞, 选健康幼虫用于试验。(2) 粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*)、斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*): 中山大学昆虫学研究所提供健康幼虫, 室内用自然饲料传代。(3) 大蜡螟 (*Galleria mellonella*): 本校昆虫生态室提供, 用人工饲料饲养。(4) 亚洲玉米螟 (*Ostrinia furnacalis*): 本校昆虫毒理室提供健康幼虫和人工饲料。(5) 菜青虫 (*Pieris rapae*): 采自菜地, 室内用甘蓝叶饲养几天后, 选健康幼虫用于试验。(6) 米蛾 (*Corcyra cephalonica*): 由广东省昆虫研究所提供, 用米糠饲养。

1.2 方法

1.2.1 DpCPV 的交叉感染试验 (1) 感染方法, 以 1×10^8 CPB/ml 的 DpCPB 水悬液均匀涂布于自然饲料上或拌入人工饲料中, 凉干后分别喂饲饥饿 8~10 h 的各种供试昆虫, 26℃ 下饲毒 2 天, 之后每 2 天换饲料一次并抽查。(2) 交叉感染的检测 1) 观察幼虫的外部特征及中肠病变情况; 2) 用氨基黑 10B 染色法检测幼虫中肠及虫粪; 3) 用 Giemsa 鉴别染色法进一步区别 NPB 和 CPB。

1.2.2 DpCPV 对粉纹夜蛾幼虫的感染 感染浓度为 1×10^8 CPB/ml, 用甘蓝叶饲养, 方法同交叉感染。

1.2.3 Tn-DpCPV 感染第一代马尾松毛虫 4 龄幼虫 将 2.28×10^8 CPB/ml 和 Tn-DpCPB 水悬液喷于松针上, 待欲滴水时止, 凉干后饲毒 70 头已饥饿 10 h 的 4 龄松毛虫幼虫 2 天, 之后每 2 天换一次新鲜松针并抽查。

1.2.4 Tn-DpCPV 对第一代马尾松毛虫 3~4 龄和 4~5 龄幼虫的毒力测定 将 Tn-DpCPV 的多角体悬液定量为 1×10^8 CPB/ml, 再逐渐稀释成 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 CPB/ml 等 5 种浓度。将 5 种浓度的悬液分别喷于新鲜松针上, 待欲滴水止。凉干后分别饲毒饥饿 10 h 的 3~4 龄和 4~5 龄松毛虫幼虫 2 天, 再换新松针继续饲养。每 2 天换一次松针, 记录死虫数 (不计 3 天内的死虫数)。试验持续至高浓度处理的死亡率达 90% 以上时结束。

1.2.5 透射电镜样中的制备与观察 将感病第 6 天的粉纹夜蛾幼虫中肠切成约 1 mm^3 的小块, 4% 戊二醛、1% 锇酸双固定, 经磷酸缓冲液反复漂洗后, 常规方法脱水、渗透、Epon812 包埋, 超薄切片厚度约 500 Å, Philips EM-400 型透射电镜下观察。

2 结果

2.1 DpCPV 感染 6 种鳞翅目昆虫幼虫的结果

表1 DpCPV对6种鳞翅目昆虫幼虫发病和死亡的影响

供试昆虫	供试虫龄 (龄)	供试虫数 (条)	接毒浓度	幼虫感病率 (%)	幼虫病死率 (%)
粉纹夜蛾 (<i>Trichoplusia ni</i>)	3	98	1×10^6	100	100
斜纹夜蛾 (<i>Spodoptera litura</i>)	3	32	1×10^6	93.33	13.33
大蜡螟 (<i>Galleria mellonella</i>)	2~3	48	1×10^6	96.0	24.0
亚洲玉米螟 (<i>Ostrinia furnacalis</i>)	2~3	29	1×10^6	100	20.7
菜青虫 (<i>Pieris rapae</i>)	3	43	1×10^6	100	56.25
米蛾 (<i>Corcyra cephalonica</i>)	3	130	1×10^6	0	0

据表1的结果,结合中肠病变的严重程度,可将DpCPV对6种鳞翅目昆虫幼虫的感染分为三种情况:(1)幼虫全部死亡,中肠病变很典型,幼虫尾部多粘有乳白色(或淡黄色)的粪粒,如粉纹夜蛾;(2)幼虫部分或少部分死亡,部分个体的中肠病变明显,但大多数幼虫中肠或粪便中可检出多角体,如斜纹夜蛾、大蜡螟、亚洲玉米螟、菜青虫;(3)幼虫发育正常,中肠及虫粪中检测不到多角体,如米蛾。在这些敏感幼虫中,病变中肠肿大、皱缩、混浊不透明,呈乳白色或淡黄色。

2.2 DpCPV对粉纹夜蛾幼虫的感染及其在中肠细胞内的复制

感病幼虫体躯缩短,体色变淡或呈黄绿相间,体节相互重叠,临死时体躯多弯曲。第5天即见病死虫,第9天,90%以上幼虫病死。有些幼虫临死前尾部粘有乳白色(少为淡黄色)的粪粒,有些则口吐淡黄混浊液(内含大量多角体)而死。病变中肠皱缩、混浊、呈乳白色,临死时中肠组织逐渐液化。

电镜下,DpCPV在粉纹夜蛾幼虫中肠细胞内的复制过程如下:在细胞质内,电子致密的病毒发生基质首先形成,基质内可见染色较深、已成熟的病毒粒子和染色稍浅,正在发育的病毒粒子(图版1)。之后,多角体蛋白在病毒粒子周围大量合成,先形成小块状结晶,这些结晶尚未包埋病毒粒子或正开始包埋病毒粒子,随着病毒粒子不断被包埋,这些结晶亦逐渐聚合(图版2,3,4),最终形成成熟的多角体(图版5)。在病毒发生基质和结晶发生基质周围,均可见大量降解的粗面内质网片段及游离的多聚核糖体(图版1,2,3,4)。此外,小型多角体可以合并成大型多角体(图版6)。

2.3 Tn-DpCPV对松毛虫的感染和毒力

2.3.1 感染4龄松毛虫幼虫的结果 Tn-DpCPV感染松毛虫4龄幼虫的第3天,可见少数幼虫中肠病变刚开始。第7天,多数幼虫中肠已呈典型病变,且前肠堵塞有大量碎针叶。第9天出现病死虫,至第14天,95%以上幼虫病死。病死幼虫体躯明显缩短,体节相互重叠,头大,刚毛直而长,多数幼虫尾部粘有乳白色粪粒,死虫稍弯曲。

2.3.2 对3~4龄和4~5龄幼虫的 LC_{50} 表2 Tn-DpCPV多角体的不同浓度对第一代
3~4龄松毛虫幼虫的感染结果

供试浓度 (CPB/ml)	对数值	供试虫数 (条)	校正死亡率 (%)	机率值
1×10^4	4.0	93	28.85	4.42
1×10^5	5.0	93	41.41	4.77
1×10^6	6.0	110	59.90	5.23
1×10^7	7.0	105	90.11	6.28
1×10^8	8.0	90	91.35	6.34

表3 Tn-DpCPV多角体的不同浓度对第一代
4~5龄松毛虫幼虫的感染结果

供试浓度 (CPB/ml)	对数值	供试虫数 (条)	校正死亡率 (%)	机率值
1×10^4	4.0	126	18.10	4.08
1×10^5	5.0	97	31.02	4.50
1×10^6	6.0	108	63.25	5.33
1×10^7	7.0	102	87.79	6.13
1×10^8	8.0	85	96.00	6.75

对表2和表3的统计分析表明, 供试浓度与幼虫死亡率呈正相关, 回归直线方程式分别为:

$$3 \sim 4 \text{ 龄幼虫: } y = 2.198 + 0.535x, r = 0.970$$

$$4 \sim 5 \text{ 龄幼虫: } y = 2.176 + 0.693x, r = 0.995$$

其回归直线见图1。

据回归直线方程, 计算3~4龄和4~5龄幼虫死亡率达30%, 50%, 70%, 90%所需多角体浓度及95%置信限, 结果分列于表4和表5。

表4 3~4龄幼虫死亡率达30%、50%、70%、90%
所需多角体浓度及95%置信限

死亡率 (%)	感染浓度 (CPB/ml)	95%置信限	
		下限 (CPB/ml)	上限 (CPB/ml)
30	1.84×10^4	7.66×10^3	4.42×10^4
50	1.73×10^5	7.20×10^4	4.16×10^5
70	1.62×10^6	6.74×10^5	3.89×10^6
90	4.26×10^7	1.77×10^7	1.02×10^8

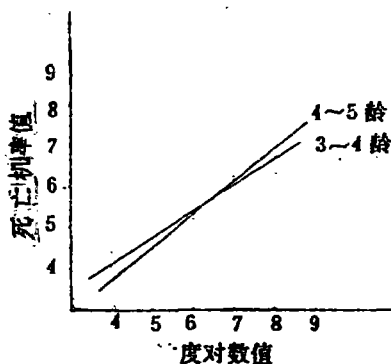
图1 松毛虫3~4和4~5龄幼虫
浓度—死亡率回归直线

表5 4~5龄幼虫死亡率达30%, 50%, 70%, 90%所需
多角体浓度及95%置信限

死亡率 (%)	感染浓度 (CPB/ml)	95%置信限	
		下限 (CPB/ml)	上限 (CPB/ml)
30	5.50×10^4	2.86×10^4	1.06×10^5
50	3.06×10^5	1.59×10^5	5.88×10^5
70	1.71×10^6	8.90×10^5	3.29×10^6
90	2.10×10^7	1.09×10^7	4.03×10^7

结果表明, Tn-DpCPV 对 3~4 龄和 4~5 龄幼虫的 LC_{50} 分别为 1.73×10^5 和 3.06×10^5 CPB/ml。

2.3.3 对 3~4 龄和 4~5 龄幼虫的 LT_{50}

表6 不同 Tn-DpCPV 多角体浓度对第1代 3~4 龄和 4~5 龄
松毛虫幼虫感染时间的回归直线方程

供试浓度 (CPB/ml)	3~4 龄	4~5 龄
1×10^4	$y = 4.9966x - 0.8036$	$y = 7.6308x - 5.4709$
1×10^5	$y = 5.4215x - 0.9244$	$y = 8.9894x - 6.7704$
1×10^6	$y = 6.2409x - 1.4573$	$y = 8.8087x - 5.7340$
1×10^7	$y = 10.5829x - 5.0917$	$y = 9.6715x - 6.1519$
1×10^8	$y = 9.0966x - 3.3294$	$y = 11.2623x - 7.3325$

表7 Tn-DpCPV 多角体的不同浓度对第一代 3~4 龄和
4~5 龄松毛虫幼虫的 LT_{50} 及其 95% 置信限

供试浓度 (CPB/ml)	3~4 龄幼虫			4~5 龄幼虫		
	LT_{50} (天)	95% 置信限		LT_{50} (天)	95% 置信限	
		下限 (天)	上限 (天)		下限 (天)	上限 (天)
1×10^4	14.50	12.78	16.46	23.56	18.57	29.90
1×10^5	12.66	11.27	14.23	20.39	16.66	24.96
1×10^6	10.83	10.15	11.56	16.64	15.82	17.31
1×10^7	8.99	8.65	9.34	14.23	13.58	14.91
1×10^8	8.23	7.87	8.61	12.45	11.96	12.97

据五种浓度的病毒多角体水悬液对 3~4 龄和 4~5 龄松毛虫幼虫所造成的死亡率, 计算所得的回归直线方程, LT_{50} 及 95% 置信限分别列于表 6 和表 7。

从表 7 可见, 随着病毒浓度的提高, LT_{50} 逐渐降低。此外, 马尾松毛虫对 Tn-DpCPV 的敏感性随幼虫龄期的增加而降低, 在低浓度感染条件下的差异尤为显著。

3 讨论

DpCPV 交叉感染的结果表明, DpCPV 能感染粉纹夜蛾、斜纹夜蛾、菜青虫、亚洲玉米

螟、大蜡螟等鳞翅目昆虫,对粉纹夜蛾幼虫的致死率可达100%,但不能感染米蛾幼虫。这些能被感染的鳞翅目昆虫分属于夜蛾科(Noctuidae)、粉蝶科(Pieridae)、螟蛾科(Pyralidae)、蜡螟科(Galleriidae)等四科,说明DcCPV具有较广泛的宿主范围,这与前人对CPV交叉感染的研究结果一致^[2,3,9]。我们对DpCPV的交叉感染结果还表明,不同昆虫种间及同一种昆虫的不同个体间对DpCPV的感受性存在明显差异,这与Noguchi et al.^[8]对家蚕(*Bombyx mori*)、美国白蛾(*Hyphantria cunea*)、赤松毛虫CPV的研究和黄冠辉等^[3]对赤松毛虫CPV的研究结果相类似。

电镜观察表明,DpCPV在粉纹夜蛾中肠细胞中的形态发生具有明显的特征,即多角体蛋白首先形成相互分割的,尚未包埋病毒粒子或正开始包埋病毒粒子的小块状结晶,随后这些结晶逐渐聚合成成熟的多角体。有关多角体的形态建成,在昆虫体内和细胞培养中均有过研究^[2,6],但对其结晶的确切机制仍在研究中。曾经在*Aedes quadrimaculatus*幼虫和四斑按蚊(*Anopheles quadrimaculatus*)幼虫的中肠细胞中观察到病毒粒子单粒包埋于四角形的蛋白结晶中,并在*Aedes taeniorhynchus*幼虫和四斑按蚊幼虫的中肠细胞中观察到单粒包埋病毒粒子的多角体蛋白结晶相互聚合的现象^[9,10],但我们的结果与这些不一致,亦未见CPV多角体这种结晶方式的报道。

感染DpCPV的粉纹夜蛾幼虫具有典型的质型多角体病病症,病死率达100%。Tn-DpCPV回接松毛虫幼虫亦获成功,对3~4龄和4~5龄幼虫的 LC_{50} 分别为 1.73×10^5 和 3.06×10^5 CPB/ml,与曾报道过的DpCPV对松毛虫幼虫的毒力^[3]相比较,两者均有所提高。粉纹夜蛾幼虫虫体较大,室内易用人工饲料批量饲养,我们认为该虫是DpCPV增殖较适宜的替代宿主,对DpCPV室内批量生产问题的解决有一定的参考价值。

致谢 本文承蒙张维球教授、王国汉教授、广东省林科所吴若光高级工程师审阅,深致谢意。

参 考 文 献

- 1 中山大学生物系昆虫学专业、电子显微镜室。马尾松毛虫质型多角体病毒研究简报。中山大学学报(自然科学版),1976,(4):11
- 2 吕鸿声。昆虫病毒与昆虫病毒病。北京:科学出版社,1985
- 3 刘清浪,吴若光等。应用马尾松毛虫质型多角体病毒防治松毛虫的研究。病毒学杂志,1986,1(4):65~72
- 4 陈昌洁,王志贤等。利用棉铃虫为宿主增殖松毛虫质型多角体病毒。林业科学研究,1990,3(3):263~265
- 5 黄冠辉,刘或桦。赤松毛虫质型多角体病毒的交叉感染试验。生物防治通报,1987,3(4):185
- 6 Belloncik S. Cytoplasmic polyhedrosis virus-Reoviridae. Adv in Virus Res. 1989, 37: 170~209
- 7 Katagiri K. Pest control by cytoplasmic polyhedrosis viruses. In: Microbial control of pests and plant diseases 1970~1980 (Burgess H D. ed.), London: Academic press, 1981, 433~440
- 8 Noguchi Y. et al. Development of disease in several species of lepidopterous insects subjected to cross-infection with cytoplasmic polyhedrosis viruses. Jap Appl Entomol Zool. 1982, 26 (4): 282~287
- 9 Payne C C., Harrap K A. Cytoplasmic polyhedrosis viruses. In: The atlas of insects and plant viruses (Maramorosch K. ed.), New York: Academic press, 1977, 109~111
- 10 Smith K M. Virus-insect relationships. London: Longman, 1976, 42~59.

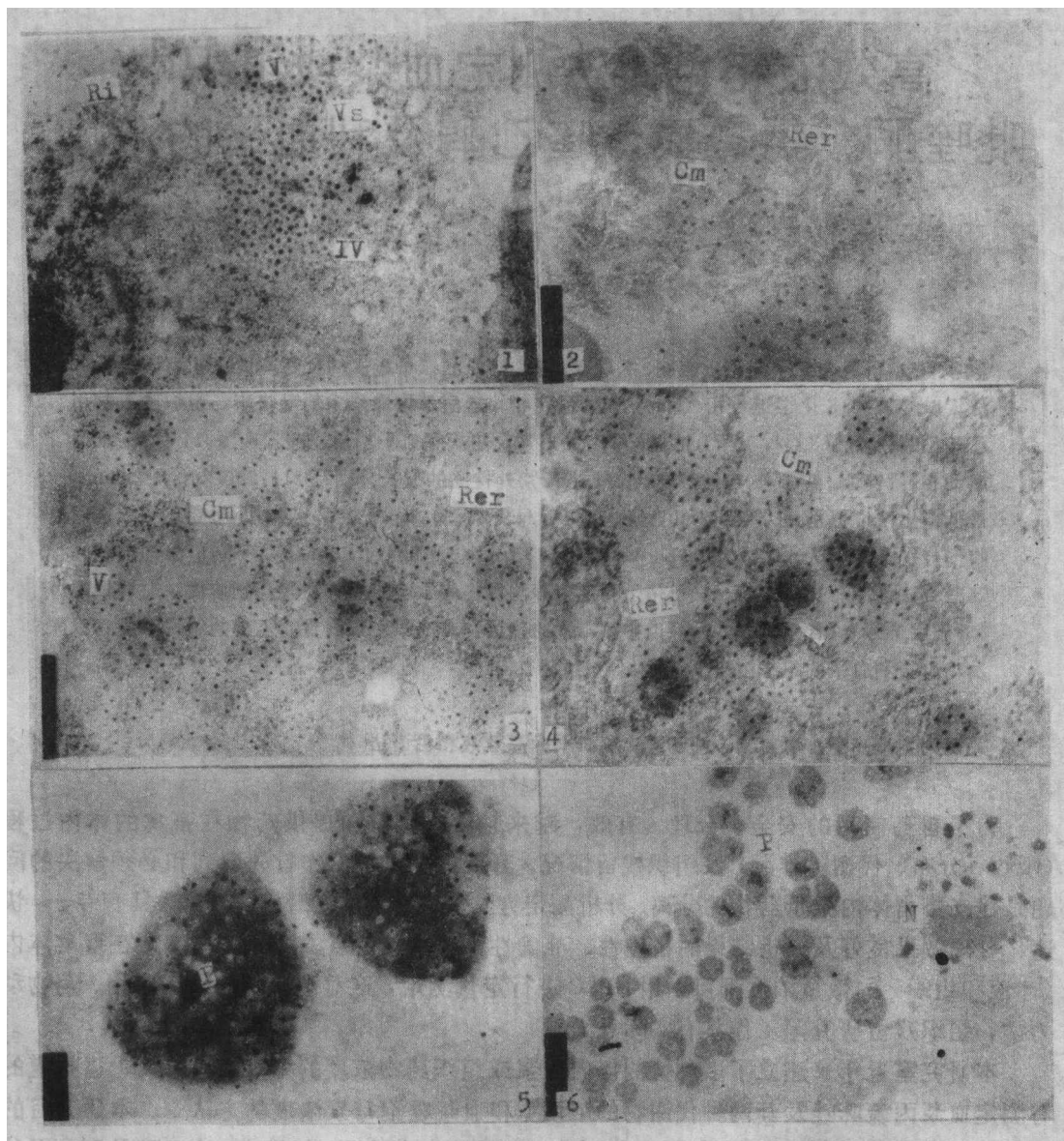
STUDIES ON THE ALTERNATE HOST OF A CYTOPLASMIC POLYHEDROSIS VIRUS
FROM THE MASSONPINE CATERPILLAR, *Dendrolimus punctatus* Walker

Zhou Xiaomao Dai Guanqun

(Plant Protection Department)

Abstract A cytoplasmic polyhedrosis virus (CPV) from the massonpine caterpillar, *Dendrolimus punctatus* Walker was successfully transmitted to the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hübner), cotton leafworm, *Spodoptera litura* (Fabricius), Asiatic corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenee) greater wax moth, *Galleria mellonella* (Linnaeus), cabbage butterfly, *Pieris rapae* Linnaeus, but not to the rice moth, *Coccyra cephalonica* (Stainton). Among the lepidopterous insects subjected to the DpCPV infection, the severity of diseases varied with the insect species. Ultrathin and EM observation showed the morphogenesis of DpCPV in the midgut cells of *T. ni* was as follows: At first, virus particles developed in the virogenic stroma which formed in the cytoplasm, then the polyhedron synthesized around them, and formed some small pieces of polyhedral crystallization, which merged into each other as they occluded virions, eventually the mature polyhedra were formed. DpCPV could propagate in the larvae of *T. ni* effectively. Bioassay of Tn-DpCPV (DpCPV which replicated in the larvae of *T. ni*) was conducted on 3~4 and 4~5 instar larvae of *D. punctatus*, the LC_{50} value were 1.73×10^4 CPB/ml and 3.06×10^4 CPB/ml respectively. The results suggest that *T. ni* is an excellent alternate host for DpCPV.

Key words Massonpine caterpillar; *Dendrolimus punctatus* Walker; Cytoplasmic polyhedrosis virus; Cross-transmission; Morphogenesis; Bioassay



图版 DpCPV 在粉纹夜蛾幼虫中肠细胞中的形态发生

1 示病毒发生基质 (VS) 的形质及其上的病毒粒子 (V) ($\times 18000$)

2 示形成相互分割的小块状多角体蛋白结晶 (cm) ($\times 23000$)

3, 4 示小块状结晶相互聚合 (箭头示) ($\times 14000$, $\times 2000$)

5, 6 示成熟的多角体 (P) 及小型多角体相互融合 ($\times 11000$, $\times 5000$)

cm: 多角体蛋白结晶; IV: 未成熟病毒粒子; N: 细胞核; P: 多角体; Rev: 粗面内质网;
Ri: 核糖体; V: 病毒粒子; Vs: 病毒发生基质