

应用马尾松毛虫质型多角体病毒 防治松毛虫的研究*

刘清浪 吴若光 曾陈湘

(广东省林业科学研究所, 广州)

提 要

马尾松毛虫 (*Dendrolimus punctatus walker*) 是我国南方松林的主要害虫。1974年, 在广州市郊龙洞地区采集到马尾松毛虫质型多角体病毒 (DPCPV), 多角体呈六边形的廿面体, 大小为0.5至6微米。病毒粒子廿面体, 直径为42—56毫微米。经过十年的研究证实, DPCPV致病力高, 对3—4龄幼虫的 LC_{50} 为 2.5×10^5 PIB/ml; 林间防治试验四万余亩, 平均杀虫率达70%以上; 持效控制作用达5—6年; 应用技术简便, 可用松毛虫幼虫生产病毒, 成本低; 对脊椎动物无病原性及致畸作用。为防治马尾松毛虫提供了一种有效的生物防治手段。

马尾松毛虫是我国南方松林的主要害虫。在广东省它每年发生3—4代, 面积达200—300万亩, 给林业生产造成严重的损失。防治马尾松毛虫是林业部门急待解决的一个主要问题。应用昆虫病毒防治害虫, 在国内外已有不少成功的实例^[1,2]。我们于1974年采集分离获得DPCPV以后^[3], 对它进行了一系列的试验和研究。本文主要报道对DPCPV研究和应用的结果。

材料及方法

病毒材料 DPCPV原毒株经虫体复制后, 以加入50%甘油病毒虫尸或提纯的病毒干粉贮存在冰箱(2—4℃)备用。

供试动物及其它 小白鼠、豚鼠由广州军马卫生研究所等单位提供。家兔、鸡蛋及金鱼购于市场。桑蚕(广东三号)由广东省蚕业研究所提供。

方法 感染病虫捣碎经差速离心提纯多角体, 用电镜观察多角体及病毒粒子的形

* 本研究得到中山大学蒲登龙教授的指导, 本文经华南农业大学戴冠群副教授审阅。曾参加工作的有陈泽藩、杨肇兴、范军祥、李徐益、邹德云、邓常发、罗彼德等同志, 以及得到有关单位的大力支持, 在此一并致谢!

本稿1985年11月15日收到

态, 石蜡切片观察组织病变。将DPCPV配制成 10×10^8 PIB/ml 为原液, 按十倍稀释法稀释成六级浓度接种松毛虫, 测定 DPCPV 对松毛虫的半数致死浓度 (LC50)。生产病毒, 室内用养虫笼 (45 × 45 × 75cm) 养虫, 每笼200条左右; 林间选择松针多的林子作生产林地放养幼虫 (7—8年生树, 平均放500条/株), 或在生产林地放入适量的卵块 (10年生树, 平均放5—6块/株), 待卵孵化发育至5—6龄虫接种病毒。从接种后第三天起收集病死虫, 至活虫感染病毒率达60—70%, 便收集所有病死虫及活虫作为提取病毒的材料。将病毒虫尸晒、晾干及制成晒干、晾干坭粉, 或制成病毒悬浮液, 以及在悬浮液中分别加入50%甘油、50%蔗糖、50%碳酸钙等物质, 分别包装后, 放在室温避光处和冰箱 (2—4℃) 中, 作贮存试验测定。太阳曝晒和紫外光照射病毒, 测定其对DPCPV毒力的影响。应用 1×10^8 — 9×10^8 PIB/ml 浓度 (或用50—500倍病毒虫尸液) 全面或块状喷洒病毒, 对各世代马尾松毛虫进行防治。在试验区及对对照区各设标准树10株作效果检查, 并对防治试验的林区进行持效作用的调查。

DPCPV 对脊椎动物的安全试验。用提纯的多角体或经降解处理的病毒粒子。将供试动物分试验及对照组, 每组雌雄各半, 试前作常规检查。试验分急性和亚急性两项。急性试验包括口服、涂皮肤、滴眼、皮下、肌肉、腹腔、静脉及鸡胚尿囊注射多角体或病毒粒子。视不同试验内容攻毒病毒数量1—3500 PIB/mlkg 体重, 观察3至21天。金鱼在含有 1×10^8 PIB/ml 的清水中饲养, 观察72小时。亚急性试验, 小白鼠口服3500亿 PIB/mlkg 体重, 观察90天。定时解剖, 将心、肝、脾、肺、肾及肠淋巴等器官切片检查, 观察其病理变化情况。对试验中死亡的动物一律进行解剖作病理检查, 对供试动物的子代生长发育进行观察。另外, 采用生物测定的方法作DPCPV与桑蚕CPV的毒力比较。

结果及分析

1. DPCPV形态及组织病理观察

在光学显微镜下, 多角体呈六边形或近圆形, 淡绿色, 具较强的折光性, 大小不一。在电子显微镜下, 多角体呈廿面体, 大小为0.5—6微米 (图版8.9), 可被溴酚兰着色, 可被 Na_2CO_3 等碱液溶解。病毒粒子呈廿面体, 在每个角上有刺状物突起, 粒子直径为42—56毫微米 (图版10)。感染DPCPV的病虫, 虫体萎缩, 头大体小, 刚毛竖起 (图版1、2)。从石蜡切片观察到, DPCPV主要引起幼虫中肠病变, 在脂肪体, 气管基质, 表皮细胞及马氏管等组织均不受侵染。病变中肠肿大变粗, 呈乳白色或米黄色, 其外表呈平滑状和皱褶状两种, 前者居多 (图版3、4)。病变中肠内含大量的多角体 (图版5、6、7)。

2. DPCPV的毒力测定及其对马尾松毛虫各虫态的致病和传递作用观察

毒力测定: 对马尾松毛虫幼虫毒力测定结果, 按Reed-Muenh法计算, 第一代4—5龄虫 (LC50) 为 3.66×10^5 PIB/ml, 第二代3—4龄虫 (LC50) 为 2.5×10^5 PIB/ml。可见, DPCPV对马尾松毛虫有较强的致病力。

用DPCPV 10^3 — 10^7 PIB/ml五种浓度接种松毛虫幼虫, 其幼虫死亡率回归直线方程式分别为: $y_1 = 3.17 + 0.36x$, 精确度为 $\pm 0.18\%$;

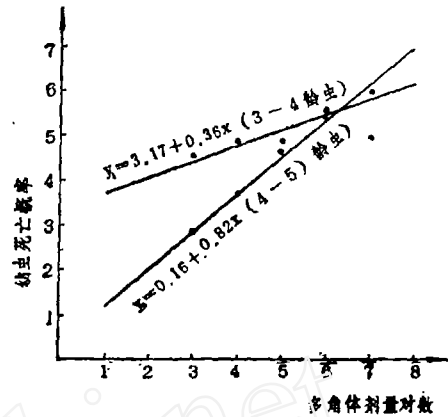
$y_2 = 0.16 + 0.82x$, 精确度为 $\pm 0.63\%$ (见图一)。从二个方程看出: 虫龄小, 幼虫死亡快; 剂量增大, 幼虫的死亡率提高。

DPCPV对各虫态致病和传递作用观察: 应用 10^6 PIB/ml浓度接种越冬代5龄幼虫, 观察49天, 其幼虫死亡率为85.0%, 取食量66.3%, 幼虫粪便带病毒后期, 平均每粒粪便含有多角体达0.051亿; 病毒致死蛹达67.7%, 活雌蛹重较对照减轻17.3%, 镜检成虫排出物, 成虫带病毒达54.9%, 带病毒的成虫有13.3%不能产卵, 产卵量比对照减少41.9%; 镜检卵表洗出液, 表明卵表面带有DPCPV。

此外, 由于其后代幼虫吞食了带病毒的卵壳, 感染致死的虫数占总死虫数(115条)的58.3%。从以上观察结果表明, DPCPV对马尾松毛虫各虫态的生长发育及繁衍的后代均能起到明显的抑制作用。同时, 通过幼虫的粪便及卵表面带毒传递, 使DPCPV能在松毛虫种群之间传播, 起到持效作用。

3. DPCP 病毒生产

依据昆虫病毒仅能在活的寄主细胞内繁殖的特异性, 我们利用养虫笼养虫生产病毒, 例如, 1984年5月间在本所用22个笼, 共养虫6008条(5~6龄), 接种病毒17天后, 收回病毒死虫3267条, 收获32530亿多角体, 平均每虫产量为9.9亿。林间放卵块养虫生产病毒, 例如, 1979年5至6月间, 在揭西县苗圃场采用这种方法, 接种病毒18天后, 在2.3亩的生产林中收获病毒虫尸93.4斤。林间放养幼虫生产病毒, 例如, 1982年及1984年的3—4月越冬代松毛虫发生期间, 在广州市郊省林业学校湿地松林用这种方法生产, 从接种病毒至结束历期30—39天, 从表1看出, 能获得较为显著的效果, 其特点是方法简便、收获量大、成本低, 防治一亩松毛虫的病毒生产费仅为0.08元。



图一 幼虫死亡率回归直线
Figure 1. Regression line of larval mortality

表 1 林间放养幼虫生产病毒的结果
Table 1 Effect of larvae reared in forest for propagating DPCPV

时 间 (年月)	地 点	符 龄 (年)	生 产 株 数 (株)	放 虫 情 况		接 种 病 毒		回 收 病 毒		
				虫 龄	总 虫 数 (条)	浓 度 PIB/ml	用 量 (亿)	病 毒 虫 尸		多 角 体 数 量 (亿)
								条 数	占 %	
1982.2	林校后山	7—8	41	5—6	90000	1×10^6	90	62560	69.5	360000
1984.3	林校后山	9—10	11	5	15085	1×10^7	600	5697	37.5	58000

4. 阳光、紫外光对 DPCPV 的影响

从试验结果(图2、3)可以看出,随阳光、紫外光照射的时间越长,DPCPV的感染率越低。当阳光照射20个日照时数、紫外光照射一小时,病毒的感染率仍达60%,表明仍有一定的毒力。但阳光照射30.8日照时数、紫外光照射2.5小时,病毒接近失活,说明阳光、紫外光对病毒具有一定的杀伤作用。

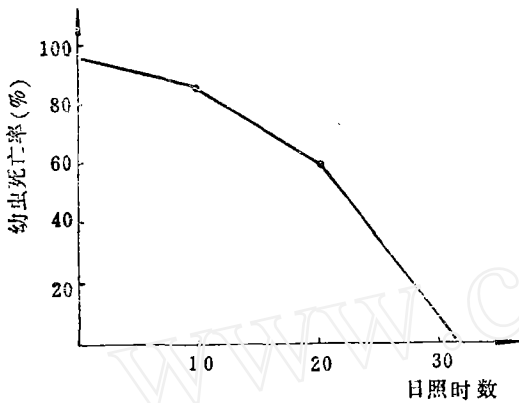


图2、阳光照射DPCPV曲线图
Figure 2. Curve line of DPCPV shined by sun

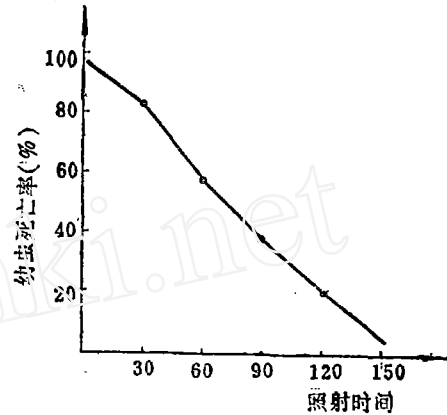


图3、紫外光照射DPCPV曲线图
Figure 3. Curve line of DPCPV shined by X-ray

5. DPCPV的贮存试验

经测定表明,50%甘油、晾干病毒虫尸及晾干病毒虫尸坭粉等,在室温避光下贮存21个月感染率为60.7—92.7%;贮存33个月感染率为25.8至56.4%,而在冰箱(2—4℃)贮6年,其感染率为85.5~95.6%,(用 9×10^6 PIB/ml浓度)。病毒悬液,以及在病毒悬液中分别加入50%甘油、50%蔗糖、50%碳酸钙等在室温避光下贮存14个月,其感染率为13.5—42.5%,而在冰箱(2—4℃)贮存同样的时间,其感染率仍达60.0—76.7%(用 1×10^6 PIB/ml)。由此可见,在冰箱(2—4℃)贮存病毒效果最佳,在室温避光下虽可贮存,但不宜过长时间,尤其是病毒悬液(包括加入各种物质)不宜在室温下贮存,否则易于丧失其致病力。

6. 应用 DPCPV 林间多点防治松毛虫试验及持效作用的调查

自1974年以来,在广东省揭西等10余个县(市),20多个点进行了防治试验,以及在省内初步示范推广,防治面积4万余亩,取得较为显著的防治效果。从多年多点防治试验的结果(表2)可以看出:DPCPV可以用于防治广东省第1、2、3代及越冬代马尾松毛虫,以防治第一代及越冬代松毛虫为佳;用 2.5×10^6 PIB/ml浓度,其杀虫率达70%以上,用100倍的病毒虫尸液,其杀虫率达65%以上;在病毒液中加入0.1%活性炭、或0.1亿孢子/ml白僵菌、或0.06%硫酸铜进行防治,其杀虫率可提高14.6~19.4%,应用病毒防治后,如阳江林场试验林明显地看到基本控制了松毛虫继续为害,保护当代松林的作用,而未用病毒防治毗邻的松林都被松毛虫吃光。此外,对海丰县西坑林场等六个用DPCPV防治试验点的调查结果(如表3)表明,病毒能在林间保留多年,如阳江

表 2 林间应用DPCPV防治松毛虫的试验结果

Table 2 Effect of control of Masson-Pine caterpillar *Dendrolimus Punctatus* by DPCPV in forest

试验地点	年份 (年)	世代	虫龄	面积 (亩)	浓度 (PIB/ml或虫尸 稀释倍)	死亡率 %	校正死亡 率 %	备 注
广州市龙眼洞	1975	三	4	1	50倍	81.3	80.3	
				5	50倍	65.8	61.8	
开平县镇海林场	1976	—	4~5	5	100倍	70.6	67.0	
				5	500倍	82.8	80.7	
高要县北岑山林场	1976	二	4~5	18	100倍	73.5	71.9	
				5	50倍	71.5	57.0	
廉江县廉江林场	1977	越冬代	5-6	5	100倍	74.5	62.3	
				5	500倍	64.2	47.0	
				250	1.6×10^6 PIB/ml	93.1	91.1	
阳江县阳江林场 流坑工区*	1978	—	4-5	20	0.32×10^6 PIB/ml	77.1	71.4	
				10	3.2×10^6 PIB/ml	96.0	95.5	加入0.1%活性炭
				10	3.2×10^6 PIB/ml	97.4	97.1	加入0.06%硫酸铜
揭西县苗圃场*	1979	—	4~5	100	9×10^6 PIB/ml	87.9	79.4	
				100	9×10^6 PIB/ml	80.6	79.4	
揭西县龙潭坡尾	1980	—	4~5	470	3.8×10^6 PIB/ml	66.7	65.2	
饶平县汤溪围罗	1980	—	4-5	800	1.9×10^6 PIB/ml	94.9	92.6	
潮州市铁铺白石岑 林场	1981	—	4-5	500	1.9×10^6 PIB/ml	42.7	37.2	
				10	0.5×10^6 PIB/ml	79.3	63.4	
普宁县林科所	1983	—	5-6	10	2×10^6 PIB/ml	78.3	61.7	
				10	4×10^6 PIB/ml	78.8	62.5	
化州县丽岗林场上 洞	1983	—	5-6	40	1×10^6 PIB/ml	64.9	59.2	
				240	3.5×10^6 PIB/ml	95.2	94.6	加入0.1%活性炭
高州县环城区红花 林场	1984	二	5-6	10	5×10^6 PIB/ml	90.3	89.0	
				10	2.5×10^6 PIB/ml	87.2	85.9	

* 阳江林场松毛虫每二年发生一次。 揭西县苗圃场松毛虫每三年发生一次。

林场试验点, 在用病毒防治后的第6年仍可在病死虫中检查出多角体; 用病毒防治后, 可控制松毛虫5—6年不成灾, 在这期间可减少马尾松毛虫大发生2—3次, 这样亦可减少松毛虫为害所造成的严重损失。

7. DPCPV 对脊椎动物的安全试验

急性毒性试验结果: 对小白鼠、豚鼠、家兔、金鱼及鸡胚等分别给予多角体或病毒粒子口服, 作腹腔、肌肉、皮下及静脉注射, 皮肤破伤感染、滴眼及鸡胚尿囊接种等处理。其结果说明对所有供试动物没有致病性及致畸作用。体重、体温、血相等正常。子代发育正常。亚急性毒性试验结果: 对小白鼠进行90天口服多角体的试验, 结果未发现异常表现和致病性, 子代正常无畸形。

8. DPCPV 与桑蚕 CPV 的毒力比较

将DPCPV及桑蚕CPV分别配制成 3.6×10^{10} PIB/ml为原液, 按10倍稀释法稀释成五级浓度接种2龄起蚕, 测定的结果, DPCPV对桑蚕的半数致死浓度(LC₅₀)的-Log值

为3.81, 而桑蚕CPV的-Log值为7.5, 两者相比较即相差3左右, 即说明DPCPV接种桑蚕的毒力比桑蚕CPV的毒力要弱1000倍。这对桑蚕生产不会产生什么影响。

表 3 应用DPCPV防治松毛虫特效作用的调查结果

Table 3 Effect of investigations on the use of DPCPV to control Masson-Pine caterpillar in standing effectiveness

调查地点	防治前松毛虫大发生时间 (年、月)	防治时间 (年、月)	防治面积 (亩)	防治后松毛虫发生时间 (年、月)	防治至调查止松毛虫不成灾时间 (年)
阳江县阳江林场流坑工区 海丰县西坑林场*	1978.5	1978.5.	300	1983.5.有虫不成灾。	6
	1974.				
	1976.5	1978.5.	10000	1983.11.有虫不成灾。	6
	1977.8 1978.5				
揭西县苗圃场	1973, 1976,	1979.5.	100	无 虫	5
	1979.5.				
揭西县龙潭坡局大队 饶平县汤溪围罗大队	1980.5	1980.5.	470	无 虫	3
	1976 1980.5	1980.5.	800	无 虫	3
潮州市铁铺白石岑林场	1976, 1977,	1981.5.	500	无 虫	2
	1981.5.				

讨 论

马尾松毛虫型多角体病毒, 多角体呈廿面体, 大小为0.5—6微米。病毒粒子呈廿面体, 每个角上有刺状物突起, 粒子的直径为42~56毫微米。多角体可被溴酚兰着色, 可被 Na_2CO_3 等碱液溶解。

DPCPV致病力高, 对马尾松毛虫3~4龄虫的半数致死浓度(LC₅₀)为 2.5×10^5 PIB/ml。林间防治效果较为显著, 杀虫率达70%以上, 用病毒后具有保护松林的作用, 可控制松毛虫5—6年不成灾。

DPCPV可作为杀虫剂, 可利用马尾松毛虫幼虫进行生产。林间放养幼虫大量生产病毒的方法, 同目前国内外昆虫病毒生产的方法比较是可行的, 其生产方法简便、产量大、成本低。

DPCPV在低温条件下可贮存数年不失效。病毒经过晾干病毒虫尸、晾干病毒虫尸坭粉及50%甘油病毒虫尸等处理, 在冰箱(2—4℃)中至少可贮存6年仍保持较高的致病力。至于能贮存多长时间, 有待进一步测定。

DPCPV对小白鼠、豚鼠、家兔、鸡胚及金鱼等供试动物, 在试验的剂量范围内没有引起任何病变, 发育正常, 子代无畸形。对昆虫病毒的安全性早已引起人们的重视, 据Ignoff等报道^[4-6], 已有22种NPV, 6种GV, 1种CPV对4个纲的20种脊椎动物作了感

受性的试验, 没有发现昆虫病毒对脊椎动物有中毒性, 致病性或异常变态作用, 日本对赤松毛虫 (*Dendrolimus spectabilis*) CPV 经过多年的研究。并做了对脊椎动物和人的口服、注射等安全试验后, 于1974年在本国登记注册应用。本试验的结果, 对脊椎动物安全性方面与之基本一致。

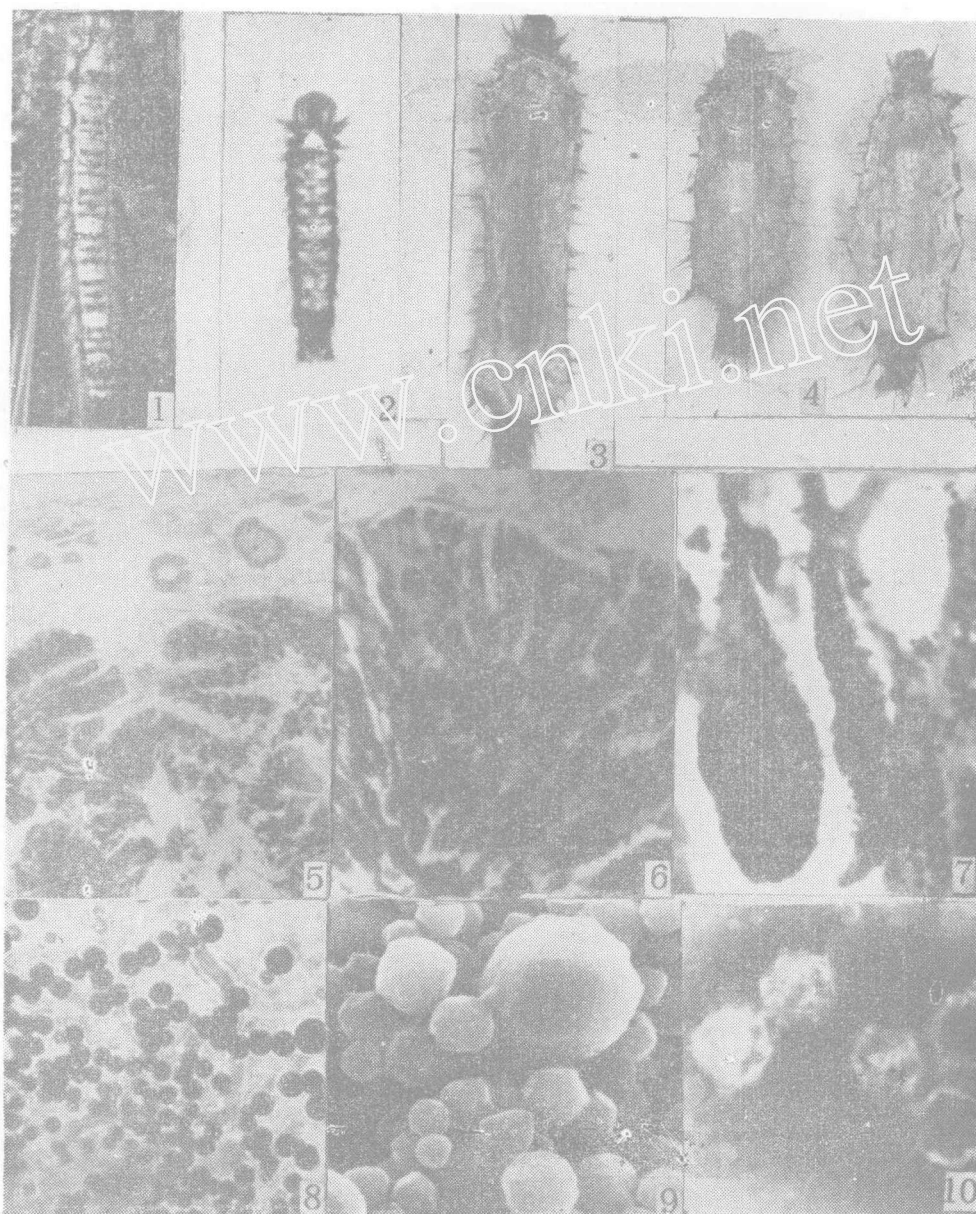


图 版

1. 健康马尾松毛虫幼虫;
2. 感染CPV的马尾松毛虫幼虫;
3. 健康中肠;
4. 发病中肠;
5. 病虫横切面;
6. 中肠病变;
7. 中肠上皮细胞内的多角体;
8. 多角体(1000x);
9. 多角体(电镜4000x);
10. 病毒粒子(电镜250000x)。

- Plata. 1, Healthy larva of Masson—Pine caterpillar,
2, Larva infected with the CPV,
3, Healthy midgut,
4, Midgut of infected the CPV larva,
5, Over section of larva infected with the CPV,
6, Midgut of diseased larva,
7, Polyhedra in the epithelial columnar cells of the midgut,
8, Polyhedra (1000X),
9, Polyhedra (4000X).
10, Virus particles (250000X).

参 考 文 献

- [1] 华南农学院林学系等译, 1979, “昆虫和螨类的微生物防治”, 科学出版社, P65~82.
[2] 吕鸿声著, 1982, “昆虫病毒与昆虫病毒病”, 科学出版社, P374~375.
[3] 中山大学生物系昆虫专业, 电子显微镜室, 1976, 中山大学学报, 3: 11.
[4] 袁祝修等, 1982, 微生物通报, 第3期, P101~105.
[5] Katagiri, K. 1981 Pest control by cytoplasmic polyhedrosis viruses in: Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980 (Burgess H. D, ed) P434-435, 438-439. Academic press, N. Y.,
[6] Ignoffo, C. M. 1965, *J. Invertebr. Pathology*, 7: 329-340.

STUDIES ON A CYTOPLASMIC POLYHEROSIS VIRUS FOR CONTROLLING MASSON—PINE CATERPILLAR DENDROLIMUS PUNCTATUS WALKER

Liu Qing-long Wu Ru-guang Zeng Cheng-xiang

(Forest Research Institute of Guangdong Province, Guangzhou)

The Masson-pine caterpillar is the most serious pest of pinus spp. in southern China. we obtained a CPV of the masson-pine caterpillar (DCPV) in the Guangzhou district in 1974. The polyhedra of DCPV are hexagonal in shape but vary in size from 0.5 to 6 μm in diameter. The virus particles are hexagonal in shape and range from 42 to 56 nm in diameter. we have been engaged in this research for ten years. The high infectivity of DCPV has been shown; the Lc_{50} is 2.5 million polyhedra/ml for third to fourth instar larvae. In forest applications over 40000 mu, mortality can exceed 70% and can persist for 5 to 6 years. DCPV can be mass produced at low cost, is harmless to vertebrates, and is an efficient biological control agent for controlling masson-pine caterpillar.