

22

银纹夜蛾多角体的诱发及分离

367-369, 封3

S435, 65

邱泽梅¹⁾ 胡晓岩²⁾ 王琦³⁾

(1)西北大学化工系, 710069, 西安; (2)陕西省轻工业学校, 710016, 西安; (3)宁夏医学院微生物教研室, 750004, 银川; 第一作者 31岁, 女, 讲师)

A 摘要 报道了对银纹夜蛾进行温度、紫外线照射、微生物(苏云金杆菌)处理, 以诱发银纹夜蛾核型多角体病毒。经分离、提取、光镜、电镜及染色观察, 可见到有多角体被诱发产生, 初步鉴定该多角体为核型多角体。实验发现后者对害虫有致死作用。

关键词 银纹夜蛾; 多角体病毒; 诱发及分离**分类号** Q939.4

生物防治, 大豆

银纹夜蛾(*Plusia Agnata* S.)别名大豆银纹夜蛾、豆青虫, 属鳞翅目, 夜蛾科, 金翅蛾属。其幼虫是大豆的主要暴食性害虫, 分布于全国主要大豆生产区, 豆田中的银纹夜蛾, 大豆小夜蛾等多种害虫常常混合发生, 结果往往严重影响大豆产量。除大豆外, 也危害棉、麻、花生、绿豆和白菜、甘蓝等十字花科植物以及香料作物薄荷等。由于长期单一地使用化学药物, 使环境严重污染, 同时害虫的抗药性增加。为了探索有效防治途径, 我们通过诱导方法诱导出病毒, 既充分利用病毒资源, 用病毒来防治害虫, 避免误杀天敌, 又减少环境污染的目的。

据文献报道^[1], 自1979年以来, 先后在我国山东、河北、成都、湖北、南通等地从自然病死虫体中分离到核型多角体病毒, 并进行了形态观察、田间试验等。关于银纹夜蛾的诱发实验还未见报道。五六十年代, 国内及国外的少数昆虫学家做过其他几种昆虫的诱发实验^[2]。据此我们对银纹夜蛾进行了温度、紫外辐射、微生物处理, 以诱发银纹夜蛾的核型多角体病毒病, 从诱发致死的虫尸中分离得到了多角体病毒。这种病毒有可能用于防治银纹夜蛾, 这在生物防治中有重要的现实意义和经济意义。

1 材料及方法

材料来源 从西安陵园路菜地及西北工业大学西面菜地采集正常生长的幼虫。

诱发实验 ①供试 126 条幼虫 4℃低温处理 36 h; ②供试 96 条幼虫, 先 37℃处理 4 h 然后再 4℃处理 2 h; ③供试 258 条幼虫, 紫外处理 1 h, 然后再低温处理 6 h。紫外灯 25 W, 距离 0.5 m; ④用微生物—苏云金杆菌添食 60 条幼虫; ⑤采自然界中的幼虫 60 条不做任何诱发正常喂养作为空白对照。

以上刚诱发完的幼虫, 无任何病症, 然后用新鲜甘蓝菜叶继续喂食。数日后, 把经处理而表现明显死亡的虫体分别放入小瓶, 冰箱保存。

多角体的分离与保存 分别将虫体捣碎研磨并加无菌水浸泡, 经 500 rpm 离心 5 min, 去除虫体残渣后再经 4 000 rpm 离心 30 min, 弃上清液, 沉淀物内加无菌水摇匀, 反复离心 4 次, 得初步提纯浓缩的乳白色多角体粗制品。此粗制品经蔗糖梯度离心提纯。方法如下: 配制 40%~60%的蔗糖梯度, 加上粗制品病毒液 4 000 rpm 离心 1 h, 取出多角体病毒带, 用无菌水洗涤多次, 除去蔗糖, 收集病毒多角体。然后将所得病毒多角体加青霉素、链霉素(1 000 U/mL)和胰酶(1%)分别除去细菌及脂肪体, 冰箱保存。

多角体的检查 将各病毒每次提取的多角体用什维佐娃染色法染色, 把多角体进行涂片、风干, 经

1:19 的甲醛-乙醇固定 10~20 min, 1% NaOH 处理 1 min, 伊红染色 3~5 min。光镜下观察多角体的形态。取各多角体悬液滴在有支持膜的电镜铜网上, 干燥后在透射电镜下观察其形态及大小。

复感染实验 将以上各病毒提取液分别涂在甘蓝菜叶上添食无病 265 条幼虫, 经 3 天喂养后改用新鲜叶片喂养, 观察幼虫的感染情况。

2 实验结果

(1) 实验可得处理幼虫后的死亡率, 结果见附表。

附表 诱发实验死亡率

Tab. The Death Rate of Inducing Test

处理条件	试供数(条)	死亡头数						总计	死亡率	化蛹数(条)
		第 3d	第 4d	第 5d	第 6d	第 7d	第 8d			
低温	126	18	9	9	3			39	31%	87
先 37℃, 后 4℃	96	6	9	6	9		3	33	34%	63
紫外辐射	172	12		16		16	4	48	28%	124
苏云金杆菌	20	3	1				2	6	30%	14
空白对照	60	1		2				3	5%	57

这些诱发而死的幼虫均有相同的病症: 初期无明显的症状, 到 3d 至 4d 后幼虫表现食欲减退, 反应迟钝, 进而体节肿胀, 体色由绿色逐渐变至黄色, 死前常爬上高处, 以尾足及腹足附着叶片等呈“7”字形倒吊而死(见图版 1, 2)。体内组织解离液化, 表皮脆软, 轻触即破, 流出白色或淡褐色浓状液体。新鲜死亡无腐臭味, 略有腥味, 涂片电镜及光镜观察见多角体颗粒。

(2) 镜检多角体的形态及大小 以上提取的多角体经电镜及光镜观察, 呈三角形、四边形、五边形及六边形和多种不规则形状, 棱角钝圆, 大小不一。大小为 0.42~1.60 μm (图版, 3, 4, 5, 6, 7, 8)。

(3) 多角体溶解及着色情况 诱发出的多角体不溶于水, 比水重, 静置有白色沉淀, 它不溶于甲醛、乙醇和二甲苯等有机溶剂, 但溶于 1% NaOH + Na₂CO₃ 溶液, 多角体可被伊红、结晶紫和番红染成粉红、蓝色及红色。

(4) 复感染实验 用提取的病毒喂 265 条幼虫后, 幼虫的病症表现为核型多角体病症, 并于 3d 后开始死亡, 共死亡 213 条, 死亡率达 80.4%。经分离、提取、镜检所得的病毒, 确证为原核型多角体病毒。

由以上分离及诱发实验知这几种诱发均可产生多角体, 且经初步鉴定这一多角体为核型多角体, 并能致虫于死地。

3 讨论

3.1 病毒的诱发实验, 在 50 年代曾有过报道, 但目前研究较少, 有关银纹夜蛾的未见报道。从本诱发实验的初步结果来看, 诱发病死虫体提取液中确实有多角体存在。

目前, 关于昆虫病毒核型多角体病诱发现象的解释有 3 种理论^[3]。第一, “病毒自生论”, 认为虫体任何正常细胞核的染色体物质都可以因理化刺激而发生遗传基因的突变, 产生病毒, 导致大量发病。第二, “潜伏性病毒活化论”, 认为正常蚕体内本身就存在有潜伏型病毒, 即前病毒, 在平时不能单独自行繁殖, 随着细胞的分裂而留存, 代代相传而不发病, 一经外界刺激, 影响虫体的生理状态即活化而致病。第三, “微量病毒感染论”, 认为极端的物化刺激引起虫体生理紊乱, 削弱了虫体的抗病力, 因此环境中的微量病毒即可造成虫病的暴发。很显然, 这 3 种说法是不相容的。根据前人的实验及本次实验, 我们认为第一种说法仅是一种假设, 缺少证据, 不能说明问题; 在本实验中用低温、紫外线照射及微生物处理以改变

虫体正常的生理状态,使虫体内潜伏的病毒活化而致死虫子,正好用第二种说法可以解释;同理第三种说法也可以解释我们的实验,第一及第二个实验也是对第三种说法实验论据的支持。有人会说:否认病毒自生论,那么潜伏型病毒及微量病毒是从何而来的呢?这正是至今悬而未解的问题。故诱发实验可用“潜伏型病毒活化论”及“微量病毒感染论”来解释,否则诱发率只能是 10^{-4} 而不是30%。

3.2 在诱发实验中,诱发率可能有所出入,这与培养条件有关:①培养时密度过大,食物不足,可能同时诱发出多角体,或一条虫诱发出了多角体,但又未及时清除,其它的虫也可能感染而死,使诱发率增大;②用于诱发的虫的虫龄过大,如6~7龄,其抗性增加,还没等多角体产生就化蛹了,所以诱发率会减小。本诱发实验中可见大多数幼虫因虫龄过大而化蛹,正是导致诱发率低的原因所在;③在复感染实验中,一是用抽提浓缩了的病毒多角体喂食幼虫,另一是考虑了虫龄而选取3~5龄幼虫进行实验,所以才得到高达80%的死亡率。

3.3 不仅在用作空白对照组的实验中发现了幼虫因病毒而死亡的现象,采集幼虫时,在自然界中也采集到了因同类病毒而死亡的幼虫,这正是对“潜伏性病毒活化论”和“微量病毒感染论”的又一说明。传染上的老龄幼虫,还未表现出病症就化为蛹,即又羽化成蛾把病毒传给下一代或传播到自然界中成为病毒源,当外界条件适合病毒活化时即可造成虫病而死。

3.4 用银纹夜蛾诱发可产生多角体病毒,并可用其灭除无病该类虫害,致病率高的结果已在实验中显示。以此推论,用同样的方法有可能诱发别的害虫如槐尺蠖等相应的病毒,并用其制成杀虫剂灭虫害,这为生物防治病虫害及保护环境提供了理论依据,具有重要的现实意义及经济意义。

责任编辑 徐象平

参 考 文 献

- 1 武汉大学病毒研究所. 中国昆虫病毒图谱. 北京: 科学出版社, 1985. 1~29
- 2 吕鸿声. 昆虫病毒与昆虫病毒病. 北京: 科学出版社, 1982. 193~197
- 3 高尚荫. 中国病毒学研究 30 年. 重庆: 科学技术文献出版社重庆分社, 1980. 144

图 版 说 明

- | | |
|-----------------------------------|-------------------------------------|
| 1~2 诱变后幼虫倒挂死亡症状 | 6 苏云金杆菌处理得病毒(电镜, $\times 11\ 000$) |
| 3 低温处理得病毒(电镜, $\times 11\ 000$) | 7 变温处理得病毒(光镜, $\times 6\ 600$) |
| 4 变温处理得病毒(电镜, $\times 8\ 800$) | 8 苏云金杆菌处理得病毒(光镜, $\times 6\ 000$) |
| 5 紫外线处理得病毒(电镜, $\times 11\ 000$) | |

The Inducement and Isolation of the Nuclear Polyhedrons Virus of *Plusia Agata* S.

Di Zemei¹⁾ Hu Xiaoyan²⁾ Wang Qi³⁾

(1)Department of Chemical Engineering, Northwest University, 710069, Xi'an; 2)The Light Industrial School of Shaanxi 710016, Xi'an; 3)Department of Microbiology, Ningxia Medical College, 750004, Yinchuan)

Abstract The inducing test of the nuclear polyhedron virus of *Plusia Agata* S. was reported here after the *Plusia Agata* S. had been treated by temperature, ultraviolet radiation and microbial. After being separated, extracted, observed by optical microscope, electronic microscope and dye, the polyhedrons were brought out and preliminarily identified that it was nuclear polyhedrons. By means of experiment, the latter was found to be of deadly effect for the injurious insect. This provided the test basis for the prevention and control injurious insect in the future.

Key words *Plusia Agata* S.; nuclear polyhedrons virus; inducement; isolation