

研究报告

## 桑毛虫 (*Euproctis similis* Fuessly) 核型多角体病毒病和田间防治试验\*

朱国凯 谢荣栋 张慧娟 姚燕儿 方兆基\*\*

(上海昆虫研究所, 上海)

1973年5月, 在上海郊区的一个桑园内, 发现了患自然流行病死亡的越冬代桑毛虫幼虫, 检验证明是感染了一种核型多角体病毒病。用电子显微镜观察, 可以看到病毒粒子在多角体内部成束状存在。每束内的病毒粒子数目大多为6—10个。游离释放出来的病毒粒子为杆状。其大小为:  $60.4 \pm 4.1 \times 347 \pm 33$  毫微米。根据1971年提出的病毒分类系统, 这种病毒是属于杆状病毒属、亚组A中的一个种。

从死虫中分离到的多角体病毒, 用来对桑毛虫进行室内感染及现场小区防治试验, 均有很强的致病力。

桑毛虫核型多角体病毒对寄主有专一性。对家蚕没有感染致病作用。

桑毛虫核型多角体病毒对桑园内桑毛虫防治提供了一个新的途径。

桑毛虫属鳞翅目 (Lepidoptera), 毒蛾科 (Lymantriidae), 主要危害桑树, 也侵害果树及其它绿化树木。在我国广东、江苏、浙江、安徽、四川、贵州等省均有发生<sup>[1]</sup>。桑毛虫幼虫腹节背面上的黑斑, 从第2龄开始, 丛生极微细的毒毛, 在显微镜下观察, 毒毛呈箭形, 带有棘刺, 脱落后, 可借风传送, 一旦落到人体刺入皮肤, 会引起皮疹, 奇痒难受。是一种可以造成流行性皮炎的病原体。

“什么工作都要搞群众运动, 没有群众运动是不行的”。1973年, 在上海市有关方面的组织下, 结合城市绿化, 开展了一场消灭桑毛虫、防止桑毛虫皮炎发生的群众运动。在广大群众的帮助下, 我们于上海市郊的一个桑园内, 发现在树枝上有大批自然死亡的越冬代桑毛虫幼虫尸体。死虫的尾足依旧攀附在枝叶上, 躯体悬空倒挂, 表皮松软, 撕扯即破, 体内流出一股乳白色的

稠脓液, 无臭味。取死虫的脓液进行镜检, 发现有大量的多角体。

昆虫多角体是一种有包涵体的病毒<sup>[2]</sup>, 它与寄生在高等动物或植物中的病毒相比, 其特点就是在发育的后期, 能在昆虫寄主的一些组织和细胞内, 形成蛋白质性质的多角体<sup>[3]</sup>。昆虫多角体病毒根据在寄主细胞中寄生部位的不同分成核型及质型两种<sup>[4]</sup>。昆虫多角体病毒对寄主有专一性, 又能耐受外界环境因子的作用, 病毒粒子在多角体内部能长期保持对其寄主感染的能力<sup>[5]</sup>。在昆虫的疾病中约有25%是由于病

本文1975年2月4日收到。

\* 本工作得到上海市川沙县高桥公社盛玲艳、沈卫跃同志; 上海动植物检疫所侯峰同志; 江苏省宜兴县丰义公社朱益明、杨可林同志; 上海第一医学院电镜室唐佩珠同志; 中国科学院生物化学研究所病毒组龚祖助等同志协助, 一并致谢。

\*\* 刘栖干同志曾参加部分工作。扫描电镜照片由马金鑫、曹明同志摄制。

毒所引起的,多角体病毒作为一种病毒杀虫剂正受到注意<sup>[6]</sup>。因此能否利用这种病毒来防止桑毛虫的猖獗危害,这对促进蚕丝生产,保障人民健康,都有着实际的意义。

在毒蛾科的 *Euproctis* 属中,已在柿黄毒蛾 (*E. flava* Bremer)、茶毒蛾 (*E. pseudoconspersa* Strand)、棕尾毒蛾 (*E. chrysoorrhoea* Linnaeus) 中发现有核型多角体病毒病<sup>[7]</sup>。石川义文(1966)报告过,在 *Porthesia xanthocampa* Dyar\* 中有核型多角体病毒病<sup>[8]</sup>。桑毛虫 (*E. similis* Fuessly) 核型多角体病毒病在我国还未有过报导。现将分离鉴定和田间防治试验的结果报告如下。

## 材料与方法

### 一、多角体病毒的分离与致病作用

#### 1. 病毒的分离

将在自然界感染多角体病毒病死亡后的桑毛虫,置于组织匀浆器内,加入无菌水,充分研磨。匀浆液用两层纱布过滤,去除组织碎块,滤液离心(2000—3000转/分钟)20分钟,即可得到白色的多角体沉淀物。吸弃上清液,沉淀内再加入无菌水或50%甘油溶液一起摇匀,重复离心几次,就可得到初步纯化的多角体。

多角体浓度可以用红血球计数法来测定。

#### 2. 感染试验

多角体病毒对桑毛虫幼虫感染的试验方法,主要是采用在桑叶背面涂加已知数量的多角体作喂饲感染。具体做法是:剪截一定面积的桑叶,在背面滴上已知数量的多角体悬浮液,待稍干后,一一分别放入经过消毒的玻璃管内,同时放入桑毛虫3龄幼虫1条。24小时后,将叶片全部食尽的桑毛虫每10条编成1组,每次5组重复。对照组则用无菌水依同法操作。每条死虫均作镜检,发现有多角体的方列入死亡率的统计中去。

### 二、多角体的检验

#### 1. 核型多角体病毒的鉴别

通过对涂片的染色反应来决定。涂片在染色前,先用10%甲醛固定5—10分钟,再用1%氢氧化钠溶液处理1分钟,洗去片上碱液,随即投

入5%伊红水溶液中染色3—5分钟。也可取感染病毒病后垂死幼虫的脂肪组织一小块在玻片间压碎后直接检查。

分离到的多角体病毒,可以直接放在显微镜或暗视野显微镜下进行观察。用扫描电镜观察前,多角体在样品台上需先用铝、银和白金进行喷涂。

#### 2. 电子显微镜观察病毒粒子

观察多角体内的病毒粒子,需先将离心沉淀得到的多角体在1%锇酸中固定2小时,然后用酒精、丙酮脱水,材料用甲丁酯(甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸丁酯)浸透和包埋,切片厚度为350 Å。染色步骤是先用醋酸铀的饱和酒精溶液进行块染,再用枸橼酸铅进行片染。

观察游离的病毒粒子,则须先用0.3%碳酸钠将多角体溶解,使病毒粒子从多角体内释放出来,随即用2%醋酸将此病毒悬浮液调节至中性,再加入0.05 M 磷酸缓冲液,从清液中取样滴膜,用磷钨酸负染,则可进行电子显微镜观察。

#### 3. 寄主专一性试验

用桑毛虫多角体病毒对属于螟蛾科、夜蛾科、灯蛾科、天蚕蛾科、蚕蛾科的5种昆虫进行了感染。方法如上述。

#### 4. 田间防治试验

在江苏省宜兴县丰义公社进行。试验区面积为400平方米(16米×25米),栽种有约1米高的桑树近600棵。试验前调查到的虫口密度,平均每棵树上桑毛虫54条。自然感病率为零。现场防治应用的多角体病毒悬浮液浓度为每毫升含有 $1.5 \times 10^4$ 个多角体。施用的多角体总剂量为 $3 \times 10^8$ 个。

## 结 果

### 一、虫体内病毒数量及其感染作用

从自然界感染多角体病毒病死亡后的桑毛虫,可分离到白色的多角体沉淀。称死虫的重量,再逐条进行多角体分离,运用加权平均法推算每毫克体重中含有的多角

\* 江崎梯三等 1958年在日本蛾类图鉴中指出日本用的这种学名,应是 *E. similis* Fuessly。

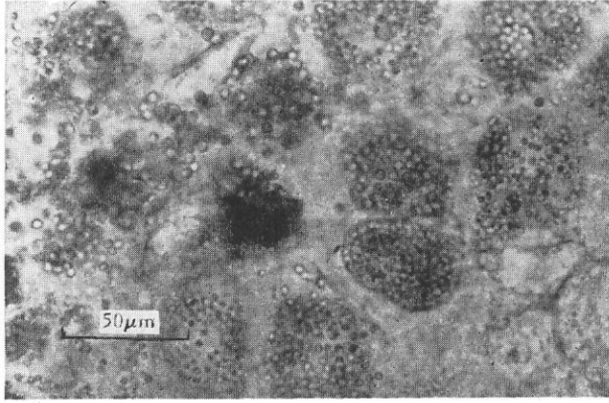


图1 桑毛虫脂肪细胞核被多角体病毒侵染

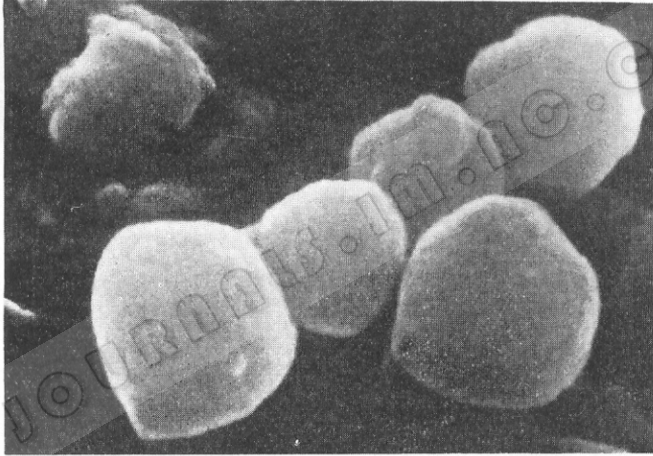


图2 在扫描电镜下观察到的桑毛虫核型多角体病毒(20000×)

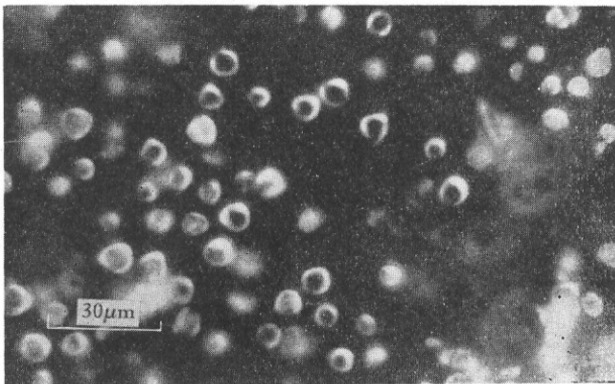


图3 暗视野显微镜观察下的桑毛虫核型多角体病毒

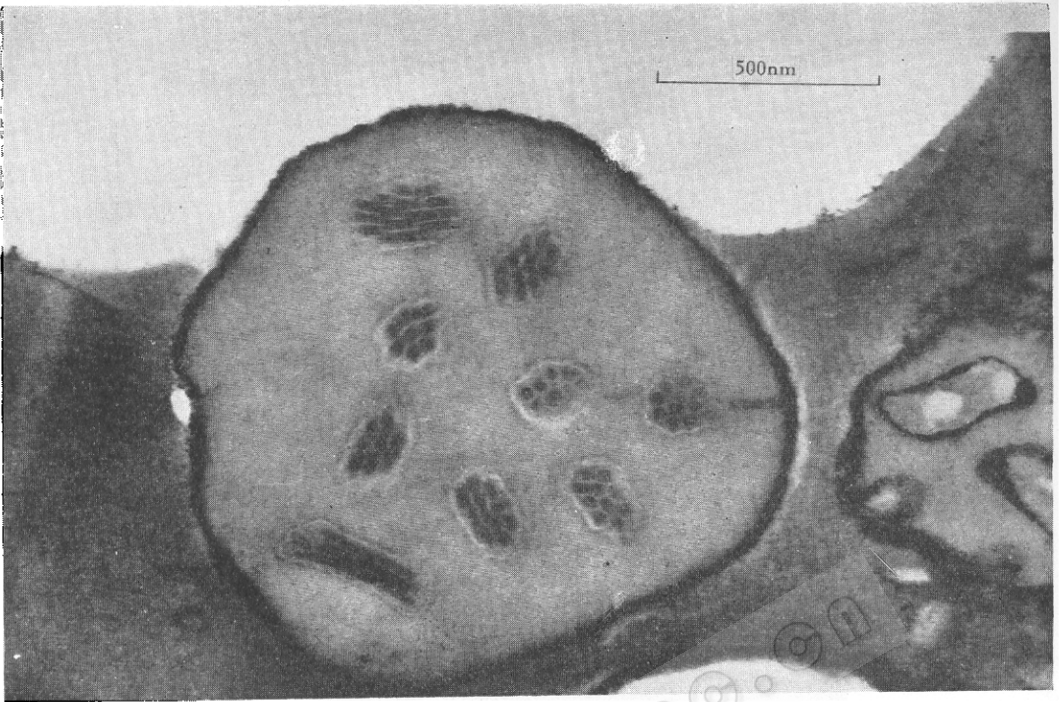


图 4-1 30000×  
电镜观察下的桑毛虫核型多角体病毒

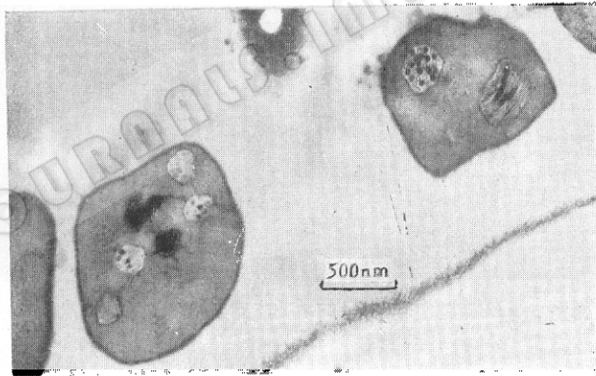


图 4-2 20000×  
电镜观察下的桑毛虫核型多角体病毒

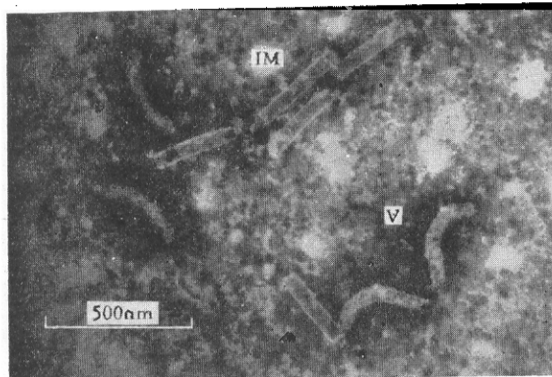


图 5 从多角体内释放出来的病毒粒子(40000×)  
V——病毒粒子， IM——内膜

体数量(表1)。

表1 桑毛虫内多角体的含量

组别(个)	组中值(x)	次数(f)	fx
1—5000	2500	5	12500
5001—10000	7500	5	37500
10001—15000	12500	13	162500
15001—20000	17500	10	175000
20001—25000	22500	4	90000
25001—30000	27500	1	27500
30001—35000	32500	1	32500
35001—40000	37500	0	0
40001—45000	42500	2	85000

$$\Sigma f \text{ 为 } 41, \Sigma fx \text{ 为 } 622500$$

$$\bar{x} = \Sigma fx / \Sigma f = 622500 / 41 = 15183$$

结果指出, 桑毛虫每毫克体重的多角体产量约为  $1.5 \times 10^4$  个。每条桑毛虫的体重一般为 100 毫克左右, 故每条幼虫的多角体产量可达  $1.5 \times 10^6$  个。

从自然死亡的桑毛虫中分离到的多角体病毒, 对其寄主仍具有很强的感染致病力(表2)。在  $30^\circ\text{C}$  条件下, 经过 5—7 天的潜伏期, 就造成死亡。剂量愈高, 发病死亡越快。

表2 桑毛虫多角体病毒对 3 龄幼虫的感病作用

感染剂量 (个/条)	时间 (天)				
	5	6	7	8	9
$4.3 \times 10^4$	55	90	95		
$4.3 \times 10^3$	10	55	95		
$4.3 \times 10^2$	10	50	75		
$4.3 \times 10^1$	0	0	30	60	70
对 照	0	0	0	0	0

饲养温度为:  $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$

## 二、检验结果

### 1. 病毒寄生在寄主细胞的核内

感染多角体病毒病的桑毛虫幼虫脂肪

组织, 用直接压片法, 在普通显微镜下可以观察到有许多聚集在细胞核内的多角体。罹病的细胞核明显增大(图1)。

多角体涂片经固定和预处理可以被伊红溶液染成粉红色。从多角体病毒在寄主细胞内寄生的部位和染色结果表明, 这是一种细胞核型的多角体病毒。

### 2. 病毒的形态

桑毛虫核型多角体病毒, 大多是不规则的立方多面体, 有四角形、六角形及近于圆形的。大小不一, 其直径在 1.25—3.75 微米之间(图2)。外表还可看到有“乳头”状及其它形状的“隆起”存在。

在暗视野显微镜下观察: 多角体呈现为一个闪烁明亮、四周具有隆起的无定形立方小体(图3)。

用电镜观察切片, 在每个多角体内可看到有许多病毒粒子由外膜(发育膜)包被成束状存在。每束内有 6—10 个病毒粒子; 多的达到 28 个(图4-1, 4-2)。从多角体内释放出来的病毒粒子均呈杆状, 稍有弯曲, 似腊肠状。每个病毒粒子平均直径和长度为:  $60.4 \pm 4.1 \times 347 \pm 33$  毫微米。还可以同时看到电子密度较疏的内膜(图5)。

### 3. 病毒寄主的特异性

用桑毛虫核型多角体病毒对 5 种昆虫进行了感染试验, 经过长期饲养观察, 均未表现出有任何病状, 发育正常, 能照常结茧化蛹(表3)。

### 4. 田间防治效果

防治试验于 1973 年 8 月进行, 喷洒多角体病毒后的第 5 天, 桑毛虫就开始发病死亡, 10 天以内即有半数以上感染致死。残存活虫在半个月后又可出现第 2 次的死亡高峰。甚至在经过 7 个月月到隔年春季, 越冬幼虫中的病毒感染率仍可达到 36% (表4), 表现出有自然流行、持续有效的作用。

表3 桑毛虫核型多角体病毒对其它5种昆虫的感染试验

昆 虫 名 称	龄 期	虫 数 (条)	多角体剂量 (个/毫升)	结 果 (条数)		
				多角体 病 死	其它死亡	活虫
蜡 螟 ( <i>Galleria mellonella</i> L.)	III	25	$2.7 \times 10^6$	0	4	21
蓖 麻 蚕 ( <i>Philosamia cynthia ricini</i> Donovan)	II	100	$2.7 \times 10^5$	0	6	94
粘 虫 ( <i>Leucania seperata</i> Walker)	III	50	$4.7 \times 10^4$	0	4	46
红腹灯蛾 ( <i>Diacrisia subcarnea</i> Walker)	III	40	$6.3 \times 10^5$	0	2	38
家 蚕 ( <i>Bombyx mori</i> L.)	I	200	$5.4 \times 10^4$	0	13	187
” ”	II	200	$2.0 \times 10^5$	0	10	190
” ”	III	100	$2.7 \times 10^6$	0	4	96
” ”	IV	50	$2.5 \times 10^6$	0	2	48

表4 田间防治效果

组 别	感染 发病率 (%)	检 查 日期	1973 年				1974 年
			8月25日*	9月3日	9月7日	9月11日	4月16日
处 理	0		0	71	30	93	36
对 照	0		0	0	0	0	0

\* 开始防治的日期

## 讨 论

1973年5月,在上海市郊危害桑树的桑毛虫中发生了流行病。经过分离检验,这是由于一种有包涵体的核型多角体病毒所引起的。这种核型多角体病毒用作田间防治试验,收到了较好的效果。寄主的专

一性很强,对家蚕没有侵染作用,因此可以考虑用作对桑毛虫进行综合防治的一种新方法。

桑毛虫核型多角体病毒,按1960年<sup>[9]</sup>提出的昆虫病毒分类系统,与 *Borrelinavirus* 属和 *Bergoldiavirus* 属的一些特征相对照(表5)指出:

表5 桑毛虫核型多角体病毒与波氏和伯氏两个病毒属的比较

病 毒	多 角 体 (微米)	寄 生 部 位	病 毒 粒 子 (毫微米)	病毒粒子形状
波氏病毒属 ( <i>Borrelinavirus</i> )	0.5—1.5	细 胞 核	20—70×200—700	杆 状
桑毛虫核型多角体病毒	1.25—3.75	细 胞 核	60.4×347	杆 状 微现弯曲
伯氏病毒属 ( <i>Bergoldiavirus</i> )	小于 1	细 胞 质 细 胞 核	30—100×200—400	杆 状 微现弯曲

桑毛虫核型多角体病毒的基本性状大部分与波氏病毒属相符,而其病毒粒子的形状与伯氏病毒属相似。近几年来,昆虫病毒的分类有了很大的变化,已被纳入到整个病毒的分类系统中去。瓦戈(Vago, C.)

等<sup>[10]</sup>指出,昆虫病毒的分类,过去都是单纯根据有无多角体、多角体内病毒粒子的数目以及病毒粒子内含有去氧核糖核酸还是核糖核酸而以人名立属,分成 *Borrelinavirus*, *Bergoldiavirus*, *Smithiavirus*, *Moratorvi-*

rus, Vagoiavirus 等 5 个属。它们都与脊椎动物和植物中的病毒毫无联系, 也体现不出整个病毒之间的亲缘关系。同时还指出, 由国际病毒命名委员会在 1971 年建议提出的病毒分类系统<sup>[11]</sup>, 基本上能解决有关昆虫病毒分类上存在的问题。按照这一分类系统, 将把昆虫有包涵体病毒列为一个新属: 杆状病毒属 (*Baculovirus*)。原先分设在波氏病毒属和伯氏病毒属中的多角体病毒和颗粒体病毒将在这个新属中列为 A、B 两个亚组。

杆状病毒属的主要特征为:

病毒粒子为杆状, 约  $40-70 \times 250-400$  毫微米, 有一层外膜, 内有一电子致密的髓核。粒子可被封闭于结晶蛋白的包涵体内。包涵体可能是圆形, 仅包含 1 个或偶尔 2 个病毒粒子(颗粒体病毒类, 亚组 B); 或者是多角形的, 含有许多粒子(多角体病毒类, 亚组 A)。据此, 桑毛虫核型多角体病毒列为杆状病毒属、亚组 A 中的一个种。

## 参 考 资 料

- [1] 祝汝佐: 中国的桑虫, 上海永祥印书馆, 新中国农业丛书, 112—113 页, 1950 年。
- [2] Steinhaus, E. A.: *Insect Microbiology*, Second Printing, Comstock, Ithaca, N. Y. p. 415, 1947.
- [3] Weiser, J.: *An Atlas of Insect Diseases*, Irish University Press, Shannon, p. 11, 1969.
- [4] Smith, K. M. and Wyckoff, R. W. G.: *Nature*, **166**: 861, 1950.
- [5] Steinhaus, E. A.: *J. Insect Pathol.*, **2**: 225—229, 1960.
- [6] Ignoffo, C. M.: *Insect Pathology and Microbial Control*, North-Holland Publishing Company—Amsterdam, p. 91—117, 1967.
- [7] Steinhaus, E. A.: *Insect Pathology, An Advanced Treatise*, Vol. 1, Academic Press, New York and London, p. 413—450, 1963.
- [8] Ishikawa, Y., H. Tanabe, C. Nakayama and T. Asayama: *J. Sericult Sci. Japan*, **35**(3): 174—180, 1966.
- [9] Bergold, G. H., Aizawa, K., Smith, K. M., Steinhaus, E. A. and Vago, C.: *Int. Bull. Bacteriol. Nomenclature Taxonomy*, **10**: 259—262, 1960.
- [10] Vago, C., Aizawa, K., Ignoffo, C., Martignoni, M. E., Tarasevitch, L. and Tinsley, T. W.: *J. Invertebr. Pathol.*, **23**: 133—134, 1974.
- [11] Wildy, P.: *Monog. Virol.*, **5**: 32, 1971.

# ON A NUCLEAR POLYHEDROSIS OF MULBERRY TUSSOCK MOTH, *EUPROCTIS SIMILIS* FUESSLY (LEPIDOPTERA: LYMANTRIIDAE) AND FIELD TEST FOR THE MOTH CONTROL

CHU KUO-KAI Hsieh YUNG-TUNG CHANG HUI-CHUAN

YAO YEN-ER FANG CHAO-CHI

(Shanghai Institute of Entomology, Shanghai)

In May 1973, many dead larvae of the mulberry tussock moth were collected from mulberry trees in the suburb of Shanghai. They had been infected by virus disease.

Polyhedral bodies were isolated from the dead larvae by filtration and centrifugation. Using scanning electron microscope, the polyhedron shows a peachy or pentagonal in shape and its size varies from 1.25 to 3.75 nm. Also, there are some "papillae" and "eminences" on its surface.

The staining properties of the polyhedron and the electron micrographs revealed that it is of a nuclear polyhedrosis. The fat bodies of the infected larvae were greatly hypertrophied and their nuclei were swollen and packed with refringent polyhedral inclusions.

Each polyhedron contains many virus particles in bundles. Each bundle contains several virion rods enclosed by an outer membrane. The number of rods per bundle may be as high as 28 and most of the bundles to be seen are composed of 6—10 rods. The virions liberated from polyhedra suspended in 0.3%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  measure about  $60.4 \times 347$  nm.

According to the classification recently proposed by the Invertebrate Virus Subcommittee of the International Committee on Nomenclature of Viruses, the

virus of *Euproctis similis* Fuessly belongs to subgroup A of the genus *Baculovirus*.

The pathogen was found to be specifically virulent to the larvae of mulberry tussock moth when transmitted perorally. The incubation period of the disease varied between 5—7 days, and was followed by death when the infected moth was reared at 30°C. This nuclear polyhedrosis virus of *Euproctis similis* Fuessly was not transmissible to *Galleria mellonella* L., *Philosamia cynthia ricini* Donovan, *Leucania seperata* Walker, *Diacrisia subcarnea* Walker, and *Bombyx mori* L.

Field test was conducted in August in mulberry fields heavily infected by the mulberry tussock moth larvae. After spraying with the suspension of polyhedrosis virus, the larvae were infected and death ensued in five days. After spraying, the mortality of the larvae went beyond 50% by the tenth day and reached 93% on September 11. It is noteworthy that natural infections were still observed next spring in the fields nearby the experimental plot.

This nuclear polyhedrosis virus of *Euproctis similis* Fuessly is new to China. It could play an important rôle, however, as a new method of control against a major pest in sericulture.