

# 赤松毛虫质型多角体病毒的 引进和利用研究\*

陈昌洁 王志贤 刘革 高志和 陶耀

(中国林业科学研究院林业研究所)

陈建寅 王震南

(浙江省安吉县林业局)

## 摘 要

从日本引进赤松毛虫CPV对我国松毛虫属(*Dendrolimus*)的七种松毛虫以及棉龄虫有较高的致死效果。根据RNA电泳图谱的研究,赤松毛虫CPV与在中国松毛虫属上的各复制株是不同的。目前,我国已发现有三种RNA类型,日本赤松毛虫CPV属第一型。JADP-CPV、JYDPW-CPV、CYDPW-CPV等属于第二型,CGDP-CPV离心所得的上带多角体属于第三型。类型II、III属首次报道。和其他CPV一样,JDS-CPV只感染中肠上皮细胞。对第一代3龄和5龄虫的 $LC_{50}$ 分别为 $1.6 \times 10^6$ CPB/ml和 $3.3 \times 10^5$ CPB/ml,对同代3龄虫的 $LD_{50}$ 为 $2.1 \times 10^3$ CPB/虫。JDS-CPV不仅对幼虫防效好,而且也影响幼虫取食、体重以及下代幼虫存活率。此病毒与Bt混用可以减少针叶被害72—80%。在油乳剂中于4℃下保存197天,在水悬液中保存5年,对此病毒活性无明显影响。以林间松毛虫作宿主可进行大量增殖。一头6—7龄幼虫平均可产多角体2亿个。

**关键词** 细胞质多角体病毒;凝胶电泳图谱;中肠上皮细胞;细胞质多角体病毒包含体;赤松毛虫

赤松毛虫质型多角体病毒(*Dendrolimus spectabilis* CPV)是世界上第一个注册使用的细胞质多角体病毒<sup>[1]</sup>。该病毒在日本用于防治赤松毛虫<sup>[2-4]</sup>,在苏联用于防治欧洲松毛虫(*D. pine*)、落叶松毛虫(*D. superans*),在我国台湾省用于防治马尾松毛虫(*D. punctatus*)均获得较好效果<sup>[7,8]</sup>。自1980年以来,我们先后从日本K. Katagiri及R. Koyama处得到部分日本赤松毛虫质型多角体病毒(以下简称JDS-CPV)的悬浮液,并对我国七种松毛虫——赤松毛虫(*D. spectabilis*)、油松毛虫(*D. tabulaeformis*)、马尾松毛虫(*D. punctatus*)、文山松毛虫(*D. punctatus wenshanensis*)、德昌松毛虫(*D. punctatus tehchengensis*)、思茅松

本文于1987年10月20日收到。

\* 本试验得到吕鸿声、钱纪放先生的大力支持和帮助。电镜照片承我院电镜室协助拍摄,特此一并致谢。

毛虫 (*D. kikuchii*)、云南松毛虫 (*D. houi*) 进行了感染试验。从感病死虫中所提取的多角体, 其外部形态基本上与原病毒形态相同<sup>[9]</sup>, 但也有其它形态的多角体 (图版 I-2-4, III-12, 13)。自 1983 年以来, 曾利用 JDS-CPV 分别对我国的马尾松毛虫、赤松毛虫以及文山松毛虫进行了较系统的研究, 林间使用效果良好, 且有垂直传递的优点, 是松毛虫综合管理中一种较理想的防治手段。本文就马尾松毛虫的试验结果报道于后。

## 一、材料和方法

### (一) 材 料

1. JDS-CPV 水悬液来自日本 K. katagiri 和 R. koyama 处。试验用材料为该水悬液在浙江安吉马尾松毛虫上的复制品。其它虫种的复制品分别由广东林科所、云南林科所和河北微生物所提供。

2. 供试 Bt 为美国 Depil 制剂。含量为每克 16 000 国际单位。

3. 供试乳化剂由钟山化工厂提供, 由非离子型聚氧乙烯脂及聚氧乙烯醚复合而成。

4. 替换宿主棉铃虫 (*Heliothis armigera*) 的卵及人工饲料配方由中国农科院钱纪放、吕鸿声先生提供。

5. 供试马尾松毛虫及油松毛虫均采自林间自然种群。

### (二) 方 法

1. 质型多角体病毒多角体 (CPB) 的提纯主要参考徐左宇<sup>[10]</sup>和 Lev A. Oslerman 的方法<sup>[11]</sup>。

2. CPV-RNA 的提取主要参考林幸之的方法<sup>[12]</sup>, 并加以改进。

3. RNA 电泳使用 1% 琼脂糖, 3% 聚丙烯酰胺, 缓冲液为 E 或 TB 缓冲液, 5V/cm 或 4mA/胶条电泳 4—6 小时, EB 染色。

4. 组织病理的观察采用常规石蜡切片。

5. 用于  $LC_{50}$  及  $LD_{50}$  测定的病毒悬液计数, 均采用血球计数板计数方法, 然后稀释至要求的浓度。供试松树枝叶及病毒喷量均保持相对一致。 $LD_{50}$  的定量是将定量针叶浸入一定浓度的病毒悬液中, 让其充分浸湿, 然后取出放入蒸馏水中, 将附着于叶上的 CPB 洗下, 计数并折算单位长度针叶上的 CPB 量。按试验要求, 定量添食单条供试昆虫。对取食完定量针叶的幼虫作系统观察, 镜检并统计死亡率。

6. 病毒复制采用林间 6—7 龄幼虫。接种浓度为  $1 \times 10^6$  CPB/ml。分别采用挂笼、围栏集虫以及林间高虫口区现场复制三种方法。

7. 棉铃虫卵经 2% 次氯酸钠表面消毒两分钟, 清水洗净, 置于 26℃、R. H. 80—90% 条件下让其孵化。幼虫孵出 24—48 小时后接种病毒。单虫接种量为  $5 \times 10^5$  CPB, 群体接种量为  $1 \times 10^6$  CPB/ml。饲养温度  $28 \pm 0.5$ ℃。光照 16 小时, 黑暗 8 小时。

8. CPV-Bt 混用试验。先将 CPB 稀释至  $1 \times 10^6$  CPB/ml, 以此液分别加入不同数量的 Bt, 形成不同浓度的 CPV-Bt 混合液。接毒方法与  $LC_{50}$  测定相同。

9. 林间效果试验采用单枝挂笼、单株罩笼以及全面喷洒的方法。后者使用动力背负式喷

雾器,浓度为 $1-3 \times 10^8$ CPB/ml或70—200亿CPB/亩。

10. 油乳剂试验。将一定量提纯的多角体混入已配制好的油乳剂中,分别置于室温以及 $4^\circ\text{C}$ 下保存。定期取样并从油乳剂中将CPB离心取出,继续在 $4^\circ\text{C}$ 下保存至197天,以 $1 \times 10^8$ CPB/ml浓度作活性测定。

## 二、试验结果

### (一) JDS-CPV 的形态及理化性质

赤松毛虫质型多角体病毒(JDS-CPV)属呼肠孤病毒科(*Reoviridae*)质型多角体病毒属(*Cypovirus*)的一个种。据报道<sup>[13]</sup>,JDS-CPV的多角体大型、中型的呈六角形、五角形、四角形、不正形。而小型的近球形。小的直径约 $0.5\mu\text{m}$ ,大的 $2-4\mu\text{m}$ ,多数 $1-2\mu\text{m}$ 。但从日本引入的JDS-CPV原株,其多角体多为六角形以及近圆形(图版I-1),但JDS-CPV在*Dendrolimus spp.*的复制株,则观察到六角形、四角形、近圆形以及锥形多角体(图版I-2—5, II-12—16)。病毒粒子为典型的正20面体,直径约50nm。六个顶端都有刺状突起(图版II-17)。这与保坂等对Bm-CPV所观察的结果是一致的<sup>[14]</sup>。由于CPV宿主范围较广,多角体外部形态难于区别,故对其株系的鉴别存在一定困难。但CPV株系间的RNA电泳图谱则差异显著<sup>[15]</sup>在多角体的梯度离心中,发现JDS-CPV在河北赤松毛虫的复制株以及广东马尾松毛虫CPV原株出现两条离心沉降带,而其它株只有一条沉降带(图版II-18,19)。形成两条带的毒株,其上带包涵体多为锥形,下带多角体为六角形(图版I-2—5)。下带CPV-RNA电泳图谱与家蚕型近似,即Payne所区划的第一型。但第5和第6条带均为两条所组成(图版III-33),故又和第一型不同(图版II-21)。其它如安徽马尾松毛虫、云南文山松毛虫、广东马尾松毛虫等复制株均和这一型相同(图版II-22—24)。而形成两条多角体离心沉降带的上带CPV-RNA的带谱则又属另一类型(图版III-32)。尽管松毛虫CPV六边形多角体的RNA与Bm-CPV-RNA电泳图谱相似,但毕竟不同。即使是JDS-CPV原株,它的RNA带谱与Bm-CPV也是有区别的:①JDS-CPV-RNA第8片段在凝胶上的电泳迁移率比Bm-CPV-RNA相同片段迁移率略低。②凝胶扩散试验显示出两者间抗原性的差异。③RNA在同源性上有差异<sup>[16]</sup>。此外,两者对松毛虫致病力的差异也极为显著,JDS-CPV对二龄蚕不会致病死亡<sup>[17]</sup>。

### (二) 病症及组织病理观察

JDS-CPV是一种经幼虫取食后,只在宿主中肠上皮细胞内复制并造成宿主死亡的昆虫病原。由于中肠再生细胞可以不断地分化形成筒形细胞而对感染的部位起到修复的作用,因此,CPV使宿主感病到死亡的时间拖得较长。幼虫感病初期无明显的症状,但很快表现出食量下降。大约取食CPB 10天左右,在光学显微镜下可查出病毒多角体。粪便中多角体数量也逐渐增多,后期排出灰白色粪便。每粒灰白粪便中,多角体含量近5000万。因此,死虫体中的多角体已留下不多,大部分在感病过程中不断被排出。感病幼虫的生长发育明显迟缓,身体缩小,头胸部显大。经JDS-CPV处理的幼虫在体重和食量上的变化情况见表1。JDS-CPV侵染中肠上皮细胞这一特点(图版III-26)与Xeros对28种昆虫质型多角体形成部位的调查结果相一致<sup>[18]</sup>。本研究也发现了感病幼虫围食膜有增厚现象,但并未发现有病毒粒子的形成<sup>[19]</sup>。

表 1 JDS-CPV处理后松毛虫在体重和食量上的变化

供试浓度 (CPB/ml)	供试虫数 (头)	平均粪量 (mg/头)	与对照的倍差	平均体重 (mg/头)	与对照的倍差
对 照	50	275		650	
$1 \times 10^4$	52	48	5.72	317.5	2.04
$1 \times 10^5$	22	36.3	7.57	209	3.11
$1 \times 10^6$	15	16.6	16.5	93.3	6.96
$1 \times 10^7$	12	8.3	33.1	75	8.66

## (三) JDS-CPV对松毛虫的活性测定

表 2 对3.5龄松毛虫生测 $LC_{50}$ 、 $LT_{50}$ 、 $LD_{50}$ 计算值

供试浓度 对数值	3龄虫死 亡机率值	5龄虫死 亡机率值	3龄虫 $LT_{50}$ (天)	5龄虫 $LT_{50}$ (天)	3龄虫 $LC_{50}$ 5龄虫 $LC_{50}$
4	3.92	4.36	37.5	111.4	$1.6 \times 10^5$ CPB/ml
5	5.39	4.36	14.3	38.5	$3.3 \times 10^5$ CPB/ml
6	5.64	5.28	12.2	28.0	
7	5.88	5.88	10.7	14.8	3龄虫 $LD_{50}$
8	6.13	6.46	8.5	13.0	$2.1 \times 10^3$ CPB/虫

从表2看出,供试浓度与死亡率以及死亡速度有密切关系。死亡率随浓度的提高而增加。五种浓度的死亡范围,3龄幼虫为14.3—87.3%,5龄幼虫为26.0—93.3%。两个虫龄的 $LC_{50}$ 值差2.06倍。假若在当代将幼虫死亡从50%提高到90%,则病毒使用量将分别提高412倍和175倍。

对3、5龄幼虫生测结果所得出的 $LC_{50}$ 、 $LT_{50}$ 以及 $LD_{50}$ 回归直线图及回归直线方程分别见图1、2和表3。

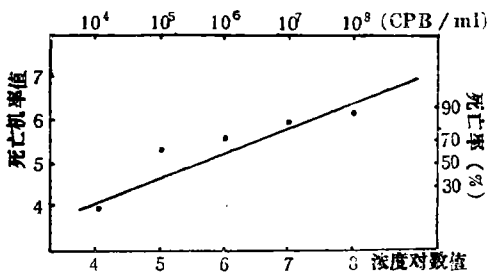


图1 多角体感染一代三龄虫浓度与死亡率回归直线  
 $y = 2.44 + 0.94x$

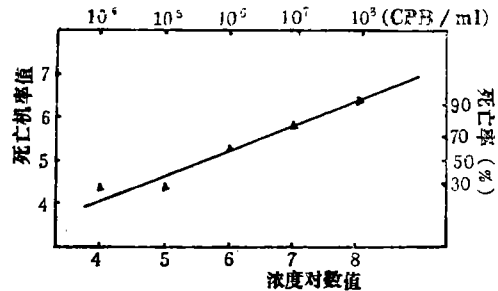


图2 多角体感染一代五龄虫浓度与死亡率回归直线  
 $y = 1.83 + 0.57x$

表 3 对3、5龄虫生测所得 $LC_{50}$ 、 $LD_{50}$ 、 $LT_{50}$ 的回归直线方程

供试浓度 (CPB/ml)	3龄虫 $LT_{50}$ 回归直线方程	5龄虫 $LT_{50}$ 回归直线方程	3龄虫 $LC_{50}$ 回归直线方程 5龄虫 $LC_{50}$ 回归直线方程 3龄虫 $LD_{50}$ 回归直线方程
$1 \times 10^4$	$y = 0.182 + 3.059x$	$y = 1.95 + 1.49x$	$y = 2.44 + 0.49x$
$1 \times 10^5$	$y = 0.57 + 3.83x$	$y = 0.78 + 2.66x$	$y = 1.83 + 0.57x$
$1 \times 10^6$	$y = -2.1 + 6.52x$	$y = 1.80 + 2.21x$	$y = 1.72 + 0.98x$
$1 \times 10^7$	$y = -0.18 + 5.03x$	$y = 0.14 + 4.15x$	
$1 \times 10^8$	$y = 0.141 + 5.2x$	$y = -1.88 + 6.17x$	

#### (四) JDS-CPV对马尾松毛虫的综合效果

JDS-CPV 对马尾松毛虫的效果不仅表现在当代感病幼虫的死亡率方面,也影响到感染幼虫的取食量、蛹重、羽化率、雌性比、产卵量以及下代幼虫的存活率(表4)。这种影响随病情的加重而变得更为显著。与对照相比,粪便量差33倍,体重差8.6倍。其回归方程分别为  $Y = 2.802 - 0.625x$ ,  $r = -0.98$ ;  $Y = 3.002 - 0.145x$ ,  $r = -0.862$ 。从幼虫粪便、蛹以及成虫体中,均可查出多角体(图版Ⅲ-27)。在感病成虫所产卵的卵壳上,也发现粘附有多角体。这是造成下代初孵幼虫早期死亡的重要原因。

表4 JDS-CPV对马尾松毛虫的综合影响

供试浓度 (CPB/ml)	平均粪便量 (mg/虫)	平均体重 (mg/虫)	平均蛹重 (mg/虫)	羽化率 (%)	雌性比	平均产卵量 (粒/虫)
对照	275	650	1300	97.9	0.53	243
$1 \times 10^3$			1100	68.7	0.48	220
$1 \times 10^4$	48.0	317.5	1100	64.0	0.53	188
$1 \times 10^5$	36.3	209.0	1100	63.2	0.46	176
$1 \times 10^6$	16.6	93.3	900	78.3	0.50	160
$1 \times 10^7$	8.3	75.0	800	73.1	0.42	84
$1 \times 10^8$			500	28.0		

#### (五) 病毒的复制

JDS-CPV 在日本的大量复制主要是利用林间6—7龄大龄虫挂笼接种复制。本试验比较了挂笼、塑料围栏集虫以及林间高虫口林地复制病毒等几种方法。其中,以后两种方式的复制量最大,且成本最低。

对围栏复制的病毒采取了两种提取方式,结果见表5、6。从中可见,由于林间处理天然活虫的感病时间、程度以及虫体的发育状态均不一致,因此,无论用那种方式提取病毒,样品间多角体数量的差异不可避免。整虫捣碎提取多角体的变异幅度为3.24—9.92亿 PIB/虫。中肠提取的是3.2—10.6亿 PIB/虫,虫体重与多角体产量无明显相关性。两种提取方法所得多角体的平均产量差异不大,分别为7.11亿和6.12亿 PIB。减少差异的办法是提高虫子的感病率。此外,对高虫口区林分进行接种或把防治与病毒复制接合起来,这是目前JDS-CPV复制最经济而有效的方法。

表5 林间复制病毒的松毛虫中肠重量与多角体产量的关系

取 样 量 (头)	中 肠 总 重 (g)	多 角 体 总 量 (亿)	平均每克多角体 (亿)	平均每虫多角体 (亿)
69	5.1	397.2	77.88	5.75
66	4.5	331.0	73.55	5.01
66	4.7	528.0	112.3	8.0
66	5.2	380.0	73.0	5.75
58	4.4	188.8	42.9	3.25
71	5.2	347.0	66.7	4.88
70	4.7	337.0	71.7	4.81
55	5.4	301.9	55.9	5.48
62	6.7	474.0	70.7	7.64
67	8.0	716.0	89.5	10.68

### (六) 替换宿主的选择

用人工饲料在28℃条件下饲养棉铃虫, 一个世代约需31—32天, 幼虫期约11天。接毒时间在幼虫孵出24—48小时内进行。接毒后11—12天即可采收。供试幼虫平均体重0.418g。增殖情况见表7。从棉铃虫上复制多角体的扫描电镜照片看出(图版Ⅲ-28), Ha-CPV的多角体与JDS-CPV在外部形态上区别不明显。但从RNA电泳图谱的结果发现, 在棉铃虫上复制的病毒不是JDS-CPV, 而是*H. armigera* CPV。但当用棉铃虫上复制的病原回接松毛虫时, 虽具有很高的感染率, 但复制病毒的核酸确是松毛虫病毒(图版Ⅲ-29, 30)。这一结果与钱纪放等的研究结果相一致\*\*。从表8结果看出, 复制品效果与JDS-CPV无大差异。由于棉铃虫可以在人工饲料上大量饲养而不受季节的限制, 这为今后松毛虫JDS-CPV的大规模工厂化生产提供了依据。

表6 林间复制病毒松毛虫体重与多角体产量的关系

取样号	整虫总重 (g)	幼虫数 (头)	多角体总量 (亿)	平均每克 (亿)	平均每头 (亿)
1	20	33	280	14.0	8.48
2	20	30	207	10.35	6.9
3	20	26	200	10.0	7.69
4	20	21	90	4.5	4.28
5	20	23	146	7.3	6.34
6	20	28	250	12.5	8.92
7	20	23	170	8.5	7.39
8	20	25	248	12.4	9.92
9	40	35	240	6.0	6.85
10	40	42	320	16.0	7.61
11	40	37	120	3.0	3.24
12	40	35	240	6.0	6.85
13	40	40	320	16.0	8.0

表7 JDS-CPV在棉铃虫上的复制数量

幼虫数 (头)	幼虫总重 (g)	中肠总重 (g)	多角体总量 (亿)	平均 CPB/g (亿)	平均 CPB/虫 (亿)
15	6.4	1.3	25.27	19.44	1.68
22	9.35	1.75	86.16	49.23	3.91
19	7.6	1.71	40.09	23.44	2.21
22	9.34	1.78	69.24	38.90	3.14
30	11.58	1.92	98.31	51.20	3.27

表8 JDS-CPV在Ha上复制品回接松毛虫的结果\*

浓度 (CPB/ml)	越冬代死亡 (%)	第一代死亡 (%)
$1 \times 10^4$	73.2	35.5
$1 \times 10^6$	73.6	61.5
$1 \times 10^8$	81.5	77.3

\* 供试虫5龄越冬代和第一代分别用木质铁纱笼和玻璃瓶饲养。

### (七) JDS-CPV 与 Bt 的混用

为克服CPV致病死亡速度慢而对保护针叶不利的缺点, 进行了CPV与Bt混用试验。其结果如表9所示, 各处理对4龄幼虫的回归方程式及回归直线图如图3所示。从表9结果可

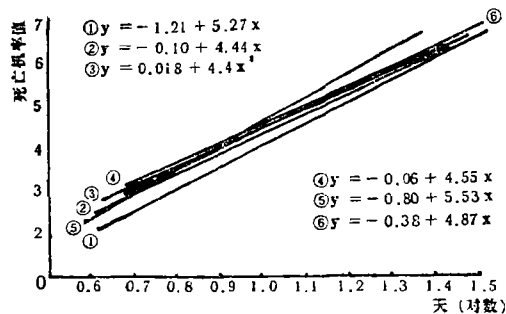


图3 混合处理二代四龄虫的死亡回归直线  
处理: ① CPV $10^8$  ② BT 5g ③ V-B 0.625g ④ V-B 1.25g ⑤ V-B 2.5g ⑥ V-B 5.0g

\*\* 钱纪放等, 1986年研究报告(待发)。

表9 CPV-Bt混合处理越冬前幼虫 $LT_{50,90}$ 的计算值

处理号*	$LT_{50}$ (天)	95% 置信界限		$LT_{90}$ (天)	95% 置信界限	
		下 限	上 限		下 限	上 限
①	15.0	6.5	34.5	26.3	7.5	92.2
②	14.0	10.8	18.2	27.3	17.5	42.7
③	13.5	10.4	17.5	26.4	17.2	40.6
④	12.9	9.8	16.9	24.7	16.2	37.5
⑤	11.1	7.8	16.0	19.0	11.0	33.0
⑥	12.7	9.1	17.6	23.3	12.9	42.1

\* 各处理详见图3注。

表10 CPV与Bt混用对幼虫排粪量的影响

处理号*	处理后不同天数平均每虫排粪量 (mg)								
	5天	8天	11天	14天	17天	20天	23天	26天	29天
CK	50.0	51.5	56.7	57.1	54.8	20.2	19.8	20.7	16.9
①	46.9	40.6	27.5	21.8	13.0	11.1	12.0	9.2	
②	6.8	2.6	2.0	2.3	2.0	1.9	1.5		
③	10.6	5.2	13.8	14.4	3.8	4.7	6.3		
④	10.6	4.6	14.3	16.1	6.7				
⑤	9.8	4.1	13.1	5.4	6.7				
⑥	6.8	4.2	12.5	8.1	7.4				

\* 各处理详见图3注。

见,  $LT_{50}$  值最大差4天,  $LT_{90}$  最大差7天。但是, 与Bt混用的重要优点是取食量明显减少。从表10、图4看出, 处理5天后与对照相比, 单用CPV的排粪量仅减少6.2%, 混用减少幅度为78—86%。17天时, CPV的排粪量减少61.83%, 混用的减少86.5—96.4%, 被害率减少到最低限度。

(八) JDS-CPV 在油乳剂中的保存试验

不同条件下保存的样品, 以  $1 \times 10^8$  CPV/ml 浓度对5龄油松毛虫做试验, 其结果见表11。结果表明, 各处理  $LT_{50}$ 、 $LT_{90}$  所需天数有差异。例如, 在油乳剂中保存32天的  $LT_{50}$  与在室温下油乳剂中保存197天的  $LT_{50}$  比较, 就有两倍之差。但低温项的这种差异明显减少。看来温度是影响保存活性的重要因子。

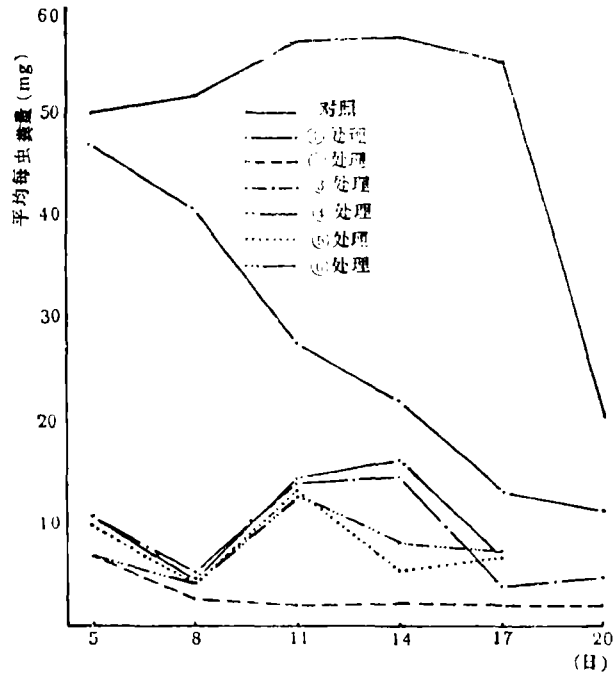


图4 CPV—Bt混合处理二代4龄幼虫后的虫粪量变化 (各处理详见图3注)

表11 多角体在油乳剂中不同保存时间、条件对活性的影响

保 存 条 件			保 存 时 间 (天)	LT <sub>50</sub> (天)	LT <sub>90</sub> (天)
4℃	油乳剂中保存		197	20.0	31.2
	水中保存		197	20.4	34.8
室 温	油乳剂中保存		197	31.9	85.7
	水中保存		197	22.1	40.6
油乳保存32天	4℃	取出后悬	197	16.6	21.5
	室 温	于水中4℃	197	16.4	22.0 <sup>*</sup>
油乳保存40天	4℃	取出后悬	197	17.6	27.4
	室 温	于水中4℃	197	21.8	39.1
油乳保存48天	4℃	取出后悬	197	17.2	26.0
	室 温	于水中4℃	197	16.0	25.2

在油乳剂中长期保存病毒，即使是低温条件，对活性也有一定的影响。除室温油乳剂 197 天项外，其它项的感病死亡率为90—100%。今后，大量使用这种剂型时，应在使用前临时配制，那就不存在多角体在油乳剂中长期保存而失活的问题。

在不同条件下的样品所作的扫描电镜观察(图版Ⅲ-34-36、Ⅳ-37-43)，并未发现多角体有破损以及病毒粒子脱落现象。1987年应用这种剂型对第一代3—4龄马尾松毛虫进行林间防治试验，效果为52.6—84.4%。

#### (九) JDS-CPV 的保存试验

用保存在4℃条件下不同时间的病原进行了室内活性测定，结果见表12、13。表明在低温条件下 JDS-CPV 的活性可以保持较长时间。1982年保存的样品至今已有5年多，但它同保存一年的样品在毒力上几乎毫无差异，这从 LT<sub>50</sub> 所需时间、死亡百分率以及死亡速率几个方面得到证实(图5)。但1982年样品开始死亡的出现期比1984年、1986年的样品略推

表12 不同保存时间的 CPV 室内活性测定

年 份 (浓度)		检 查 日 期										
		7/Ⅶ	8	9	10	11	13	14	16	18	20	21
1982 (1×10 <sup>7</sup> /ml)	1				3.5	7.1	25.0	28.5	50.0	82.1	92.8	100
	2				3.7	11.1	14.8	33.3	55.5	88.8	100	100
1984 (1×10 <sup>7</sup> /ml)	1					8.0	16.0	28.0	64.0	96.0	96.0	96.0
	2	3.8	3.8	3.8	7.6	19.2	34.6	42.3	57.6	80.7	96.1	96.1
1986 (1×10 <sup>7</sup> /ml)	1	7.1	7.1	7.1	7.1	21.4	32.1	42.8	64.2	82.1	89.2	96.4
	2				3.4	3.4	13.7	37.9	51.7	75.8	86.2	100
NP-40 (2%)	1								3.4	3.4	3.4	3.4
	2								3.4	6.8	13.7	13.7



表13 不同保存时间的CPV活性测定

年份 (浓度)		统计项目	回归直线方程	LT <sub>50</sub> (天)	LT <sub>90</sub> (天)
1982 (1×10 <sup>7</sup> /ml)	1		$y = -6.07 + 11.1x$	11.25	14.67
	2		$y = -7.56 + 12.15x$	10.08	13.77
1984 (1×10 <sup>7</sup> /ml)	1		$y = -7.17 + 11.49x$	11.45	14.81
	2		$y = -0.65 + 5.74x$	10.78	18.48
1986 (1×10 <sup>7</sup> /ml)	1		$y = -0.22 + 5.13x$	10.41	18.48
	2		$y = -6.90 + 11.2x$	11.54	15.02

迟。此外，对1982年用活性炭吸附并保存于4℃冰箱中的样品用6龄松毛虫作喂食试验，结果也全部感病死亡。

(十) 林间防治效果试验

几年来，利用JDS-CPV对马尾松毛虫进行了多次林间试验。现将各次试验结果摘要列入表14。结果证实，JDS-CPV用于防治松毛虫有较好的效果。但死亡率的变异幅度较大，这涉及的因子较多，往往在生产性防治时不可避免，但在防治时，必须充分地考虑到CPV的特点：

1. 由于CPV具有致病死亡速度慢的特点，处理林地的虫口密度不宜过高，否则对松针的保护不利，而且残留虫数也较多。

2. 对高虫口区处理时，应掌握在初龄幼虫阶段进行，或者与Bt混合使用，甚至可以加入一定量的化学农药。本试验曾加入1/20万国产敌虫菊酯，这一浓度对5—6龄幼虫不至致死，但混入后使感病率提高约10%，时间可提前约一周。

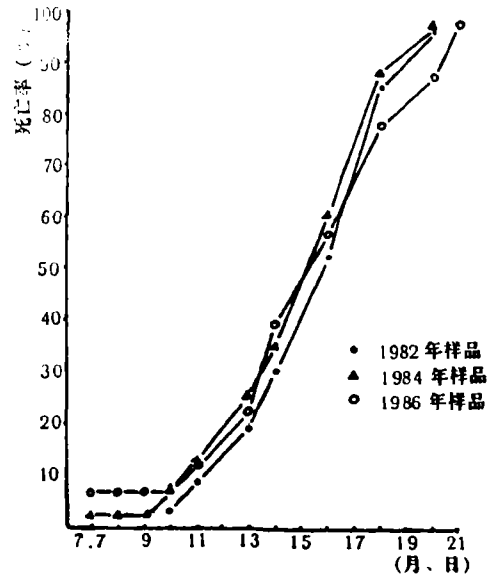


图5 保存时间与CPV活性的关系

表14 JDS-CPV的林间防治效果

时间 (月、日)	地点	处理面积 (亩)	虫龄	病毒浓度 (CPB/ml)	处理方式	效果 (%)
1982.6.8	浙江龙山林场		3—4	1×10 <sup>3,5,7</sup>	单株喷酒后采虫套笼	31.6—78.3
1984.6—7	“		5	1×10 <sup>6</sup>	全喷后整株罩笼	62.0—98.0
1984.6—7	“		4—5	1×10 <sup>6</sup>	单枝处理套笼	90—100
1984.10	“		4	1×10 <sup>6</sup>	全喷后整株罩笼	97.8
1985.6—7	“		5	1×10 <sup>6</sup>	单枝处理套笼	86—100
1985.6	“		5—6	1×10 <sup>6</sup>	单枝处理套笼	98.4
1986.4	安徽潜山黄铺区	20	5—6	1×10 <sup>6</sup>	全喷后设标准株	69.0
1986.10	安徽潜山黄铺木孟凸	50	4	1×10 <sup>6</sup>	全喷后设标准株	79.9—91.2
1987.4	安徽潜山黄铺五坂林元	140	5—6	3×10 <sup>6</sup>	全喷后设标准株并采虫挂笼	15.3—78.5
1987.6	安徽潜山黄铺庙冲村	200	3—4	200亿/亩	油乳剂超低容量处理标准株和挂笼	52.6—84.4

3. 越冬前使用是有利时机, 可在越冬代 2—3 龄幼虫期进行。试验结果, 有时在越冬前的死亡率即超过 90%, 根据日本的试验结果<sup>[17]</sup>, 120 天的试验期, 10 个多角体即可造成供试虫 50% 死亡。

4. 对环境温度应有所考虑, 特别是早春气温偏低而多雨的省份, 防治适期应抓住第一代和第二代(可在九月中进行)。温度高, 幼虫取食多, 病毒增殖快, 可以加快致病进程, 防效较好。

### 三、讨 论

根据本试验对松毛虫 CPV 的几个原株, 以及 JDS-CPV 在我国松毛虫 (*Dendrolimus* spp.) 上的几个复制株所作 RNA 电泳图谱表明, JDS-CPV 对我国松毛虫的感染似乎不是复制, 而可能是对供试寄主 CPV 的诱发。Payne<sup>[16]</sup>在三株细胞质多角体病毒的比较研究中发现, JDS-CPV-RNA 带谱为九个片段, 十个基因组, 属于他所区划的第一类型。本试验结果与其相一致。但本试验所有供试株的 CPV-RNA 带谱与引入病原 JDS-CPV 的带谱均不相同。此种情况若确系诱发, 必然涉及病毒潜伏感染的问题, 需要深入研究。同时, 过去对 CPV 具有较广宿主域的看法, 也值得进一步研究。

CPV 感染率高, 致病死亡速度慢以及它具有良好的垂直传递效果等特点, 从根本上破坏了宿主种群的正常增殖趋势。保留一定数量携带这种病毒的种群, 对松林生态系统的稳定性是有益的。实践证明, 在 CPV 试验过的林分, 已显示出具有较长时期的持续效果。因此, CPV 应该被认为是松毛虫综合管理中的一种较为理想的手段。目前, 试验性应用面积已达到 1.4 万亩, 取得了良好的防治效果。

### 参 考 文 献

- [1] Keio Aizawa, 1976, Recent development in the production and utilization of microbial insecticides in Japan. Proceeding of the first international colloquium on invertebrate pathology and IXth annual meeting society for invertebrate pathology, Queens University at Kingston Canada, 59—63.
- [2] Burges, H. D., 1981, Microbial control of pest and plant diseases, 1970—1980.
- [3] 小山良之助等, 1965, マシカレハに対するスミシマウイルスの野外散播試験, 第76回日本林学会大会演讲集, 371—374.
- [4] 小山良之助等, 1966, スミシマウイルスにするマシカレハ防除試験(Ⅰ)散播时期别比较試験, 第77回日林大会演讲集, 359—363.
- [5] Koyama, R., 1966, On the control of the pine caterpillar using Smithiavirus, Trans 77th J. Jap For. Soc. (In Japanese), 359—374.
- [6] 在原登志男等, 1977, マツケミンの散布濃度と効果の検討, 森林防疫, 26(8), 127—129.
- [7] Ying, S. L., 1970, Application of *Isaria* sp., Cytoplasmic Polyhedrosis Virus and *Bacillus thuringiensis* against the pine caterpillar *Dendrolimus punctatus*, Q. J. Chinese For., (4):51—68.
- [8] Ying, S. L., 1986, A decade of successful control of pine caterpillar *Dendrolimus punctatus* by microbial agents. Forest Ecology and Management. (15):69—74.
- [9] 林试场昆虫第一室, 1966, 图说マツカレハ中肠细胞质型多角体病, 森林防疫, 15(4), 120—127.
- [10] 徐左宇等, 1986, 棉铃虫质型多角体病毒的某些生物物理和生物化学特性, 病毒学报, 2(4), 335—343.
- [11] Osterman, Lev. A., 1984, Methods of protein and nucleic acid research, Springer, 1(1):219—236.
- [12] 林幸之等, 1965, 家蚕的细胞质多角体 RNA にコヒコ(1)细胞质多角体から抽出されえ特异的 RNA, 日本蚕丝学杂志, 34(2): 83—89.
- [13] 吕鸿声, 1982, 昆虫病毒与昆虫病毒病, 科学出版社.
- [14] Maramorosch, K., 1977, The atlas of insect and plant viruses (the Cytoplasmic Polyhedrosis Virus).

- [15] Payne, C. C., 1976, A provisional classification of Cytoplasmic Polyhedrosis Virus based on the sizes of the RNA genome segments, *J. Gen. Virol.*, 33:71—85.
- [16] Payne, C. C., 1978, A comparative study of three closely related Cytoplasmic Polyhedrosis Viruses, *J. Invert. Pathol.*, 32:310—318.
- [17] 付美英, 1983, 天敌微生物制剂松开命(DCV水和剂), 山东林业译丛, (1), 64—74.
- [18] Xeros, N., 1966, Light microscopy of the virogenic stromata of Cytopolyhedroses, *J. Invert. Pathol.*, 8:78—79.
- [19] 丁翠等, 1983, 黄地老虎质型多角体病毒病的研究, 微生物学报, 23(1), 20—25.

## STUDIES ON INTRODUCTION AND UTILIZATION OF THE PINE CATERPILLAR *DENDROLIMUS* *SPECTABILIS* CPV

Chen Changjie Wang Zhixian Liu Ge Gao Zhihe Tiao Liang  
(The Research Institute of Forestry CAF)

Chen Jianyin Wang Zhennan  
(Forest Bureau of An Ji County, Zhejiang Province)

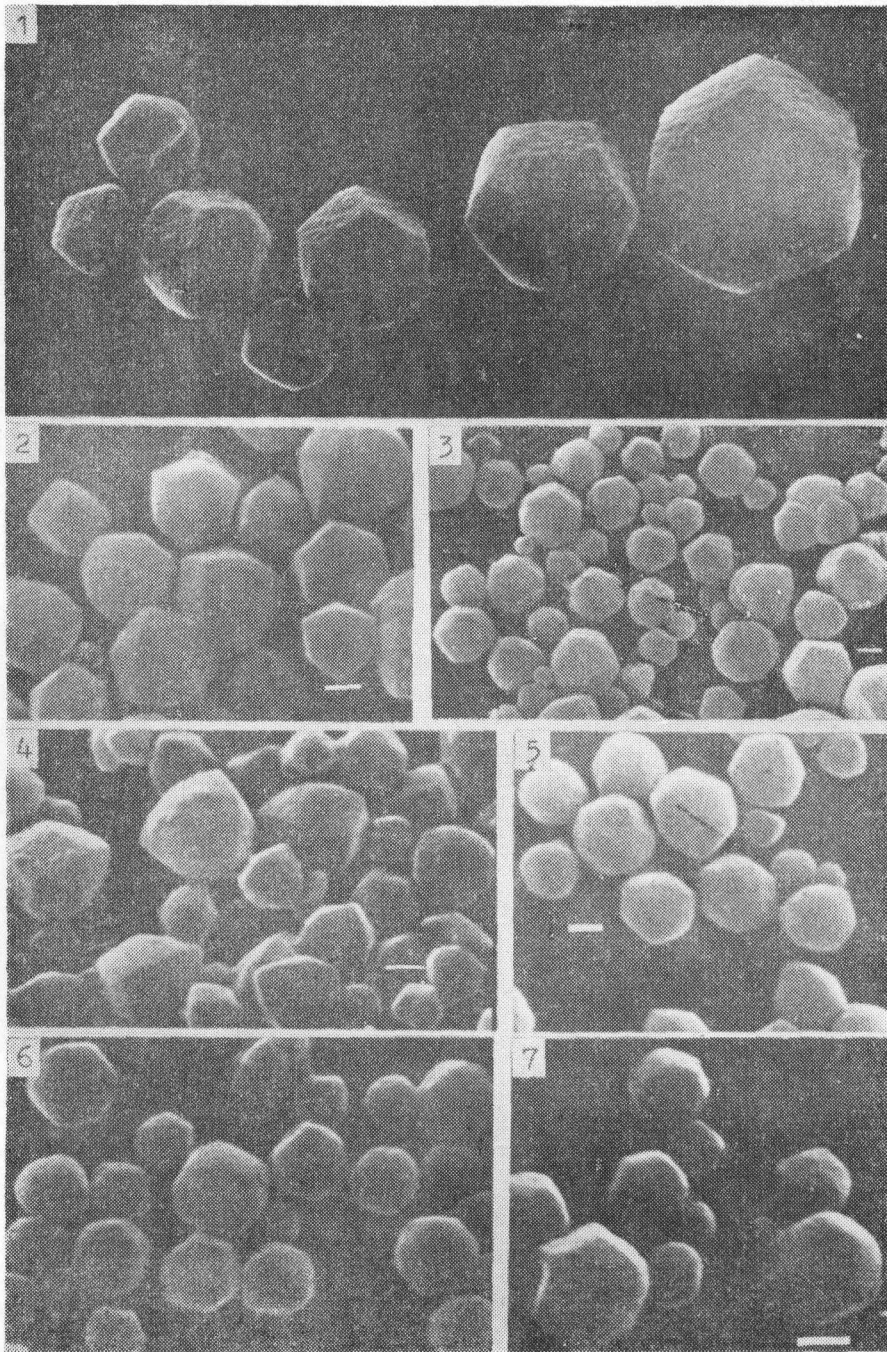
### Abstract

The pine caterpillar *Dendrolimus spectabilis* CPV (JDS-CPV) introduced from Japan could give high mortality both to seven species of the pine caterpillar in the genus *Dendrolimus* and to the cotton borer *Heliothis armigera* in China. According to the study of gel profiles of CPV-RNA the JDS-CPV is different from the strains which replicated in the *Dendrolimus* spp. in China. So far we have found three types of gel profiles of nucleic acid. JDS-CPV belongs to type one. JADP-CPV, JYDPW-CPV, JGDP-CPV, CYDPW-CPV etc. belong to type two. The up band of CGDP-CPV belongs to type three. Type two and three are reported for the first time.

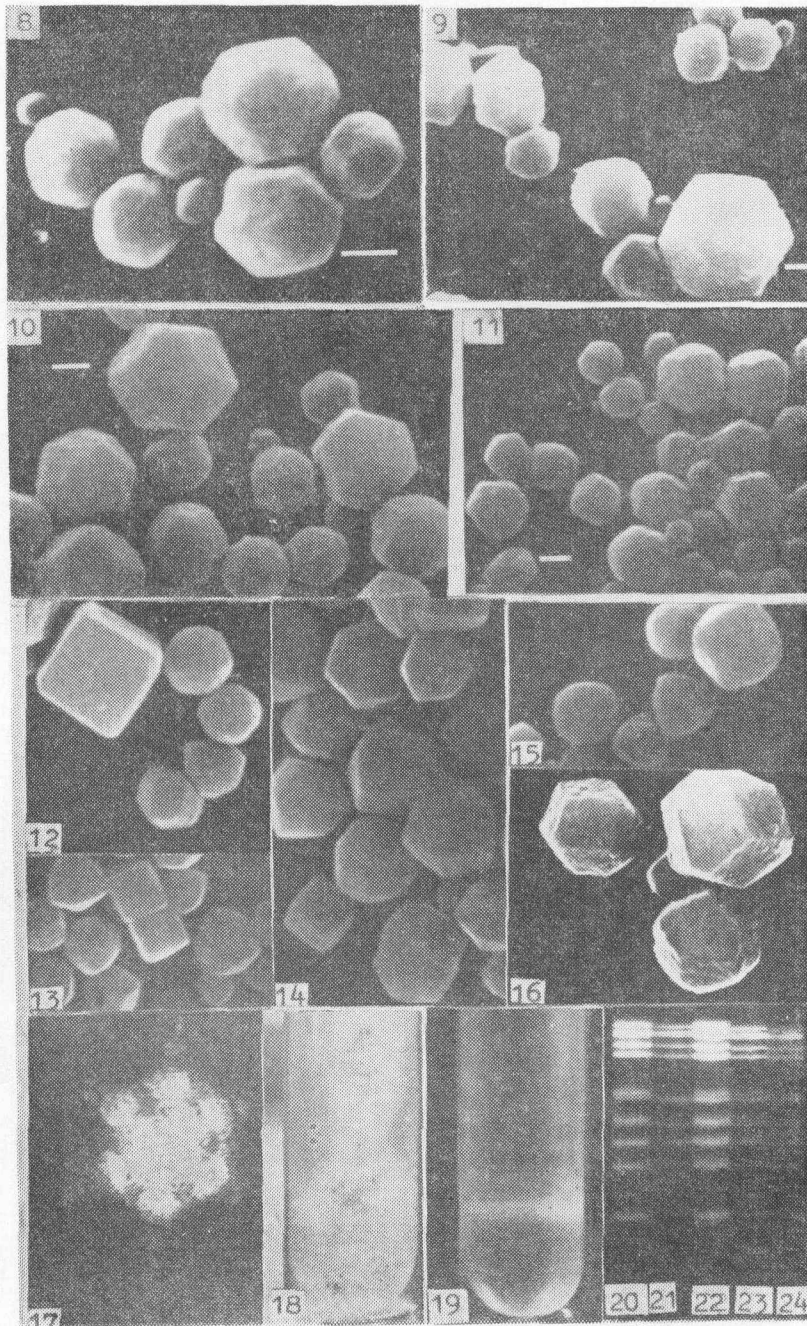
JDS-CPV affects only the midgut epithelial cells as all other CPVs. The  $LC_{50}$  for the third-instar and fifth-instar larvae of the first generation are  $1.6 \times 10^5$  CPB/ml and  $3.3 \times 10^5$  CPB/ml respectively. The  $LD_{50}$  for the third-instar larvae of the same generation is  $2.1 \times 10^3$  CPB/larva by bioassay. The JDS-CPV not only gave the best control to the larvae, but also affected feeding, body weight and even the survival rate of larvae of the next generation. Applying the mixture of JDS-CPV and Bt resulted in 72—80% reduction of feeding. After storing it in oil emulsion at 4°C for 197 days or in liquid suspension under 4°C for five years, the biological activity of JDS-CPV could not be affected noticeably.

The host used for mass production of JDS-CPV are the pine caterpillar larvae from pine plantation. An average yield obtained is more than  $2 \times 10^8$  CPB per larva of 6-7th-instar.

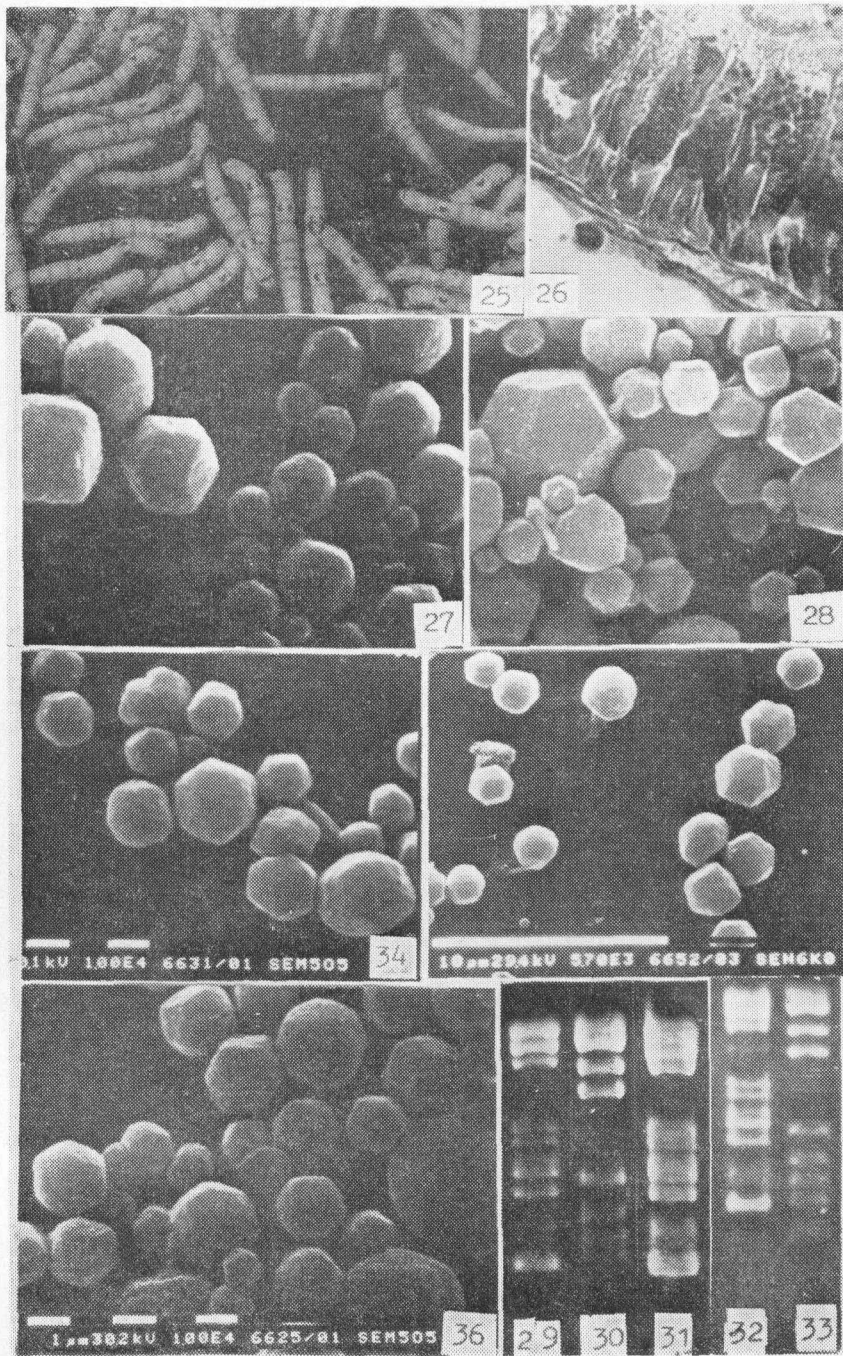
**Key words:** CPV; gel profiles of CPV-RNA; midgut epithelial cells; CPB  
*Dendrolimus Spectabilis*



1. JDS-CPV原株多角体  
2. *D. punctatus* (广东) CPV原株上带多角体  
3. *D. punctatus* (广东) CPV原株下带多角体  
4. JDS-CPV在*D. spectabilis*上复制株的上带多角体  
5. JDS-CPV在*D. spectabilis*上复制株的下带多角体  
6. *D. punctatus wenshanensis* CPV原株多角体  
7. JDS-CPV在*D. punctatus Wenshanensis*上复制的多角体



8. JDS-CPV在*D. punctatus tehchangensis*上复制的多角体  
 9. JDS-CPV在*D. kikuchii*上复制的多角体  
 10. JDS-CPV在*D. tabulaeformis*上复制的多角体  
 11. JDS-CPV在*D. punctatus*(安徽)上复制的多角体  
 12-16. JDS-CPV原株及复制株不同形态的多角体  
 17. JDS-CPV的病毒粒子形态  
 18. JDS-CPV多角体离心沉降带  
 19. JHDP-CPV多角体离心沉降带  
 20. CYDPW-CPV-RNA带谱  
 21. JDS-CPV-RNA带谱  
 22. JYDPW-CPV-RNA带谱  
 23. JADP-CPV-RNA带谱  
 24. JGDP-CPV-RNA带谱



25. 接毒而未发病的家蚕  
26. 被侵染的松毛虫中肠上皮细胞  
27. JDS-CPV在松毛虫蛹、成虫体内的多角体  
28. JDS-GPV在Ha上复制的多角体  
29. JDS-CPV→Ha-CPV-RNA带谱  
30. JDS-CPV→Ha-CPV→CDP-CPV-RNA带谱  
31. HaCPV-RNA带谱  
32. 上带多角体RNA带谱  
33. 下带多角体RNA带谱  
34. 多角体在油乳剂中室温下保存197天  
35. 多角体在水中室温下保存197天  
36. 多角体在油乳剂中4℃保存197天

