

油松毛虫质型多角体病毒病的 组织病理研究

王志贤 陈昌洁

(中国林业科学研究院林业研究所)

摘 要

本文报道油松毛虫感染JDS-CPV后的组织病理变化过程。幼虫感病后,食欲降低,从感病到死亡的时间较长,一般为20 d左右,长的达一个月或者更长。观察了CPV引起中肠上皮细胞的病变过程以及病毒发生基质(VS)与多角体在细胞质中的发育形成。VS初期为许多不定形的小块,以后小块逐渐增大,合并成团块,多角体在这些团块中形成长大。幼虫病变限于中肠,其他组织尚未发现病变。虽然见到围食膜有增厚现象,但未见到有多角体形成。

关键词 松毛虫; 质型多角体病毒; 中肠; 上皮细胞; 病毒发生基质

松毛虫是我国林业主要害虫,每年发生面积达4 000万亩以上。近年来,利用微生物防治松毛虫取得了较好效果,特别是病毒的利用发展很快,已取得理想的结果^[1-4]。通过日本赤松毛虫质型多角体病毒*Dendrolimus spectabilis* CPV (JDS-CPV)对油松毛虫*D. tabulaeformis*感染后的组织病理学研究,可以准确地了解JDS-CPV的致病部位和进程,为病毒大量复制的最适采收期提供了可靠的依据。现将试验结果报道于后。

一、材料和方法

(一) 材料

1. 日本赤松毛虫质型多角体病毒(JDS-CPV)系日本K. Katagiri和R. Koyama赠送,该病原在马尾松毛虫上复制,将复制材料离心提纯后,配制成 2.5×10^7 CPB/ml的悬浮液备用。

2. 供试宿主为越冬后5—6龄的油松毛虫,在25—27℃, R. H. 70%条件下,经一段时间饲养后,选健康幼虫添食病毒。

(二) 方法

1. 接毒 将洗净的针叶浸入 2.5×10^7 CPB/ml悬液中,取出凉干后,饲养健康幼虫,在25—27℃, R. H. 70%条件下,饲养观察。

2. 取样 幼虫接毒后,每隔24 h取2条虫,用Bouin-Duboscq固定液固定,共取样13

次,同时设立未接毒幼虫为对照。

3. 病症观察 接毒后每隔24 h取感病幼虫中肠,在光学镜下作病变情况观察。

4. 石蜡切片 取接毒后1、3、5、7、9、11、13 d和对照幼虫中肠,用常规石蜡组织切片法进行脱水、包埋、切片,厚度为6—7 μ 。用Hamm氏改进染色法染色^[6],光学镜观察并拍照。

5. 多角体及病毒粒子的观察 取感染CPV的松毛虫中肠,经戊二醛、锇酸固定后,用812环氧树脂包埋,超薄切片,1%醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色,电镜观察。提纯的多角体用0.2 M碳酸钠—碳酸氢钠缓冲液处理,将离心后的上清液浓缩,取其悬浮液滴于铜网上,经负染后电镜观察。

二、结 果

(一) 松毛虫质型多角体病毒病病变观察

1. 外部病症 幼虫感病初期,外部病症不明显,解剖见到中肠仍为透明的淡绿色,中肠pH为6.5—7。当感病4.5 d后,幼虫取食量逐渐减少,中肠上有分散的乳白色小斑点,幼虫行动表现萎靡,肠道上的白点增多,连成一片,白色程度增加,面积也越益增大,直到中肠全部变为白色,呈不透明状(图版 I-10)。此时,前肠堆积较多未消化的针叶,说明肠道消化状况由于病毒的增殖而受到影响,取食量也越来越少。多数中肠表面会出现许多横纹皱褶,从白色皱褶的真皮细胞中可镜检到大量的多角体(图版 I-11、II-14)。肠中食物甚少,中肠的pH已上升到8左右。在口吐物和粪便中亦能查到无数的多角体。虫体逐渐缩短,形成头大体小的不正常病态。体内脂肪体也大大减少,但体液仍澄清。最后中肠完全被破坏,成为乳液状。尾部常带有黄白色的稀粪(图版 I-9),通过镜检可发现大量的多角体。同时也观察到少数感病中肠肠壁光滑无皱褶,其它症状同前。在自然情况下,由于幼虫吞食病毒量不同,所处条件也不尽相同,因此,患病幼虫致死的时间也有差异,个别的为10 d,大部分为15—20 d左右,最长的达一个月或更长时间。部分感病轻微的幼虫可以化蛹甚至羽化为成虫,但蛹和成虫的体型均较小,在成虫的肠道及其排泄物中也含有大量的多角体(图版 III-28)。由于卵表受到排泄物污染,初孵幼虫因取食卵壳而感病,造成下代幼虫大量死亡。

2. 组织病变

(1) 根据石蜡切片观察,幼虫组织病变主要在中肠,而前肠、后肠、脂肪、血细胞、表皮、神经等组织均未见异常,与正常幼虫组织相似(图版 I-1—8)。中肠细胞病变一般由中肠后部开始,逐渐向中肠前部扩展,直到整个中肠全部病变。中肠的肠壁细胞病变也不完全相同,有时半边肠壁感染严重,半边较轻或一块严重,一块较轻。有时部分充满多角体的细胞已经破裂,同时也可见到感染较轻的肠壁细胞,说明感染是先后进行的。

(2) JDS-CPV首先侵染中肠柱状细胞,而杯状细胞比柱状细胞感染晚。多角体在细胞质内形成,被侵染的细胞较正常细胞肿大。感染初期,中肠细胞质的着色不均匀,尤其是近微绒毛下的一侧,细胞着色比正常细胞深一些(图版 II-16),核仁稍膨大。感病4.5 d后,在中肠细胞的上、中部(微绒毛的下面)形成数量不等、形状不定、边缘不清的病毒发生基质(VS),用Hamm液染色,VS着色比细胞质染色稍深(图版 II-17),呈淡灰蓝色,容易识别。

随着VS增大染色也愈深(图版Ⅱ-18—20),各VS块逐渐相互连结成不定形的大块,VS染色呈蓝色。随之,VS块增大,轮廓逐渐趋于清晰,呈椭圆形或楔形(图版Ⅱ-20、21),并且染色由蓝变为紫红色,在VS内部形成形状较小还难以分辨的多角体。从图版Ⅱ-20、21、Ⅲ-22—25可见到着色深的多角体团块,随时间增长,多角体渐渐增大,成熟的多角体在光学镜下呈红色的六角形、方形或近圆形(图版Ⅲ-26)。在一个多角体团块中的多角体大小相似。由于多角体团块形成先后不同,故在一个切面上可见到大小不同的多角体(图版Ⅲ-25、26)。当肠壁细胞充满多角体时,往往细胞核被挤在细胞底部。在幼虫感病期间,中肠肠壁内均可找到CPV形成过程中的不同阶段(图版Ⅲ-24—26)。还观察到围食膜有增厚现象^[6],但未见有多角体形成。

(3) 幼虫感病后3 d内,细胞病变不很明显,第4天可见到中肠后部的细胞中出现VS或个别的小多角体。第5天中肠中部的细胞明显感染。第7天中肠前部已见到细胞病变,中后部中肠细胞里充满多角体(图版Ⅲ-23),有少量细胞破裂,多角体从中脱离。第8天由于病毒增殖而遭到破坏的细胞,从肠壁脱落者愈来愈多。感病13 d的中肠里食物残渣很少,而出现大量脱落的细胞碎片及多角体。濒死前,肠壁已不完整,多角体大部分被排出体外(图版Ⅲ-29、30)。因此,收集病原的时间不能等待幼虫死亡,而应在死亡前一段时间采收。

(二) 病原

1. 多角体一般为六角形,少数为四方形或近圆形。多角体大小差异较大,大的可达5.185 μm,小的0.5 μm左右,平均约2 μm(图版Ⅱ-14、Ⅲ-28)。

2. 病毒粒子呈廿面体的圆球形,在其表面可见到对称的放射状突起,其直径约50 nm(图版Ⅱ-12、13)。据报道一个多角体内约有1 000个病毒粒子^[7],但多角体内病毒粒子数量因多角体大小而有很大差异,有的小多角体切面仅3—4个病毒粒子,甚至没有;而大多角体切面病毒粒子的数量有上百个之多。多角体的大小和病毒数量的差异是十分悬殊的。因此,为避免多角体的破裂而造成病毒粒子的散失,选择最适的保存条件是十分重要的。

三、结论与讨论

根据病毒寄主范围、病毒颗粒的形态以及在感染细胞中产生多角体等特点,JDS-CPV与呼肠孤病毒有明显的区别^[4]。病毒复制部位仍限于中肠上皮细胞,含等轴病毒粒子,病毒基因为双股RNA,包括10个基因片断^[8]。其病症、致病过程和感病组织部位与Xero报道对家蚕CPV研究情况相似。感病较轻的松毛虫在化蛹后,破碎的上皮细胞及多角体进入肠腔。病蛹以及成虫中肠均大于正常虫的中肠,这与Ishikwa等对感病家蚕的研究情况类同。JDS-CPV在松毛虫中肠组织病变和VS形成,与秋尺蠖(*Alsophila pometaria*) CPV^[9],棉铃虫(*Heliothis armigera*) CPV等^[10,11]有相似处,但病程的差异随不同虫种生长发育期的长短而有变化。病虫中肠内绝大部分多角体在幼虫死亡前均随粪便排出体外。此外,也观察到感染最严重的幼虫生殖腺似乎也出现病变现象,但是否与CPV侵染有关,尚需进一步研究。

参 考 文 献

[1] Katagiri, K., 1981, Pest Control by cytoplasmic polyhedrosis virus, microbial control of

- pests and plant diseases 1970—1980, Edited by Burges, H. D., 433—440.
- [2] Ying, S. L., 1970, Application of *Isaria* sp., cytoplasmic polyhedrosis virus and *Bacillus thuringiensis* against pine caterpillar *Dendrolimus punctatus* (Lepidoptera: Lasiocampidae), Q. J. Chinese For., 4, 51—68.
- [3] Ying, S. L., 1986, A decade of successful control of pine caterpillar *Dendrolimus punctatus* Walker (Lepidoptera: Lasiocampidae) by microbial agents, Forest Ecology and Management, 15, 69—74.
- [4] 陈昌洁等, 1988, 赤松毛虫质型多角体病毒引进和利用的研究, 林业科学研究 1(1), 14—24.
- [5] Hamm, J. J., 1966, A modified Azan staining technique for inclusion body viruses, J. Invertebr. Pathol., 8(1), 125—126.
- [6] 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.
- [7] 生物课, 1974, マツカレハ細胞質多角体病ウイルスを主成分とする製剤(水和剤)の検定法, 農薬検査所報告, 第14号97—102.
- [8] Maramorosch, K., 1977, Cytoplasmic polyhedrosis viruses, the atlas of insect and plant viruses, Academic Press NEW YORK, 105—129.
- [9] Hukuhara, T., 1985, Pathology associated with cytoplasmic polyhedrosis virus, viral insecticides for biological control, 121—149.
- [10] 乐云仙等, 1981, 棉铃虫质型多角体病毒的形成, 昆虫学报, 24(4), 475—476.
- [11] 吴若光等, 1984, 马尾松毛虫质型多角体病毒形态及组织病理的观察, 林业科技通讯, (10), 26—27.

HISTOPATHOLOGICAL STUDY ON CYTOPLASMIC POLYHEDROSIS VIRUS OF THE PINE CATERPILLAR (*DENDROLIMUS TABULAEFORMIS*)

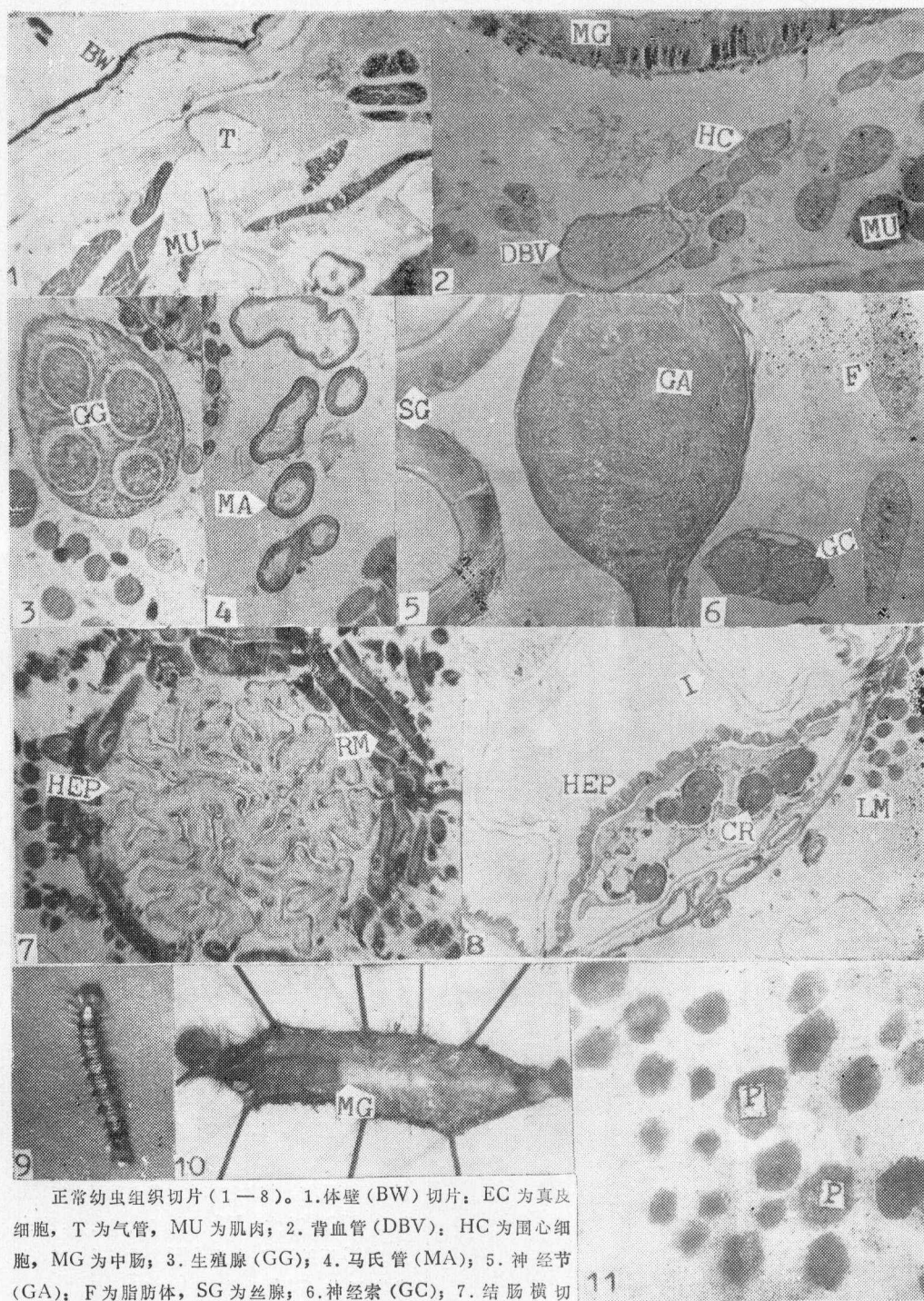
Wang Zhixian Chen Changjie

(The Research Institute of Forestry CAF)

Abstract

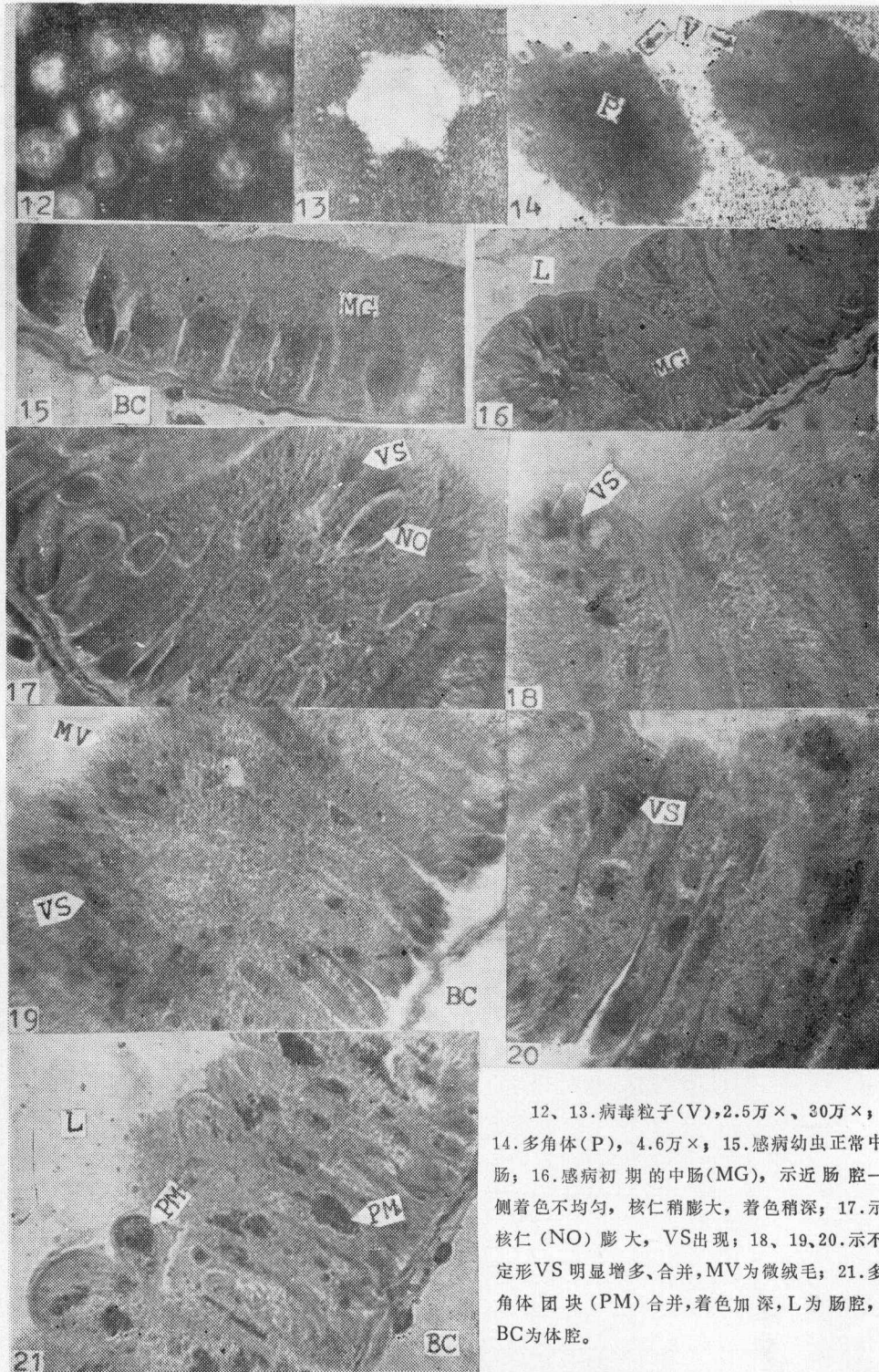
This paper reports the processes of histopathologic change of the pine caterpillar larvae infected with JDS-CPV. The infective tissue is confined to the epithelial cell of the midgut. The development and formation of the virogenic stromata (VS) and polyhedra of the virus in cytoplasm were observed in early stage of infection, the VS of CPV appeared as irregular small pieces. Since then, the great masses of VS and CPB were formed. It was also found that the funned changed in thickness, but did not find any polyhedron body in it.

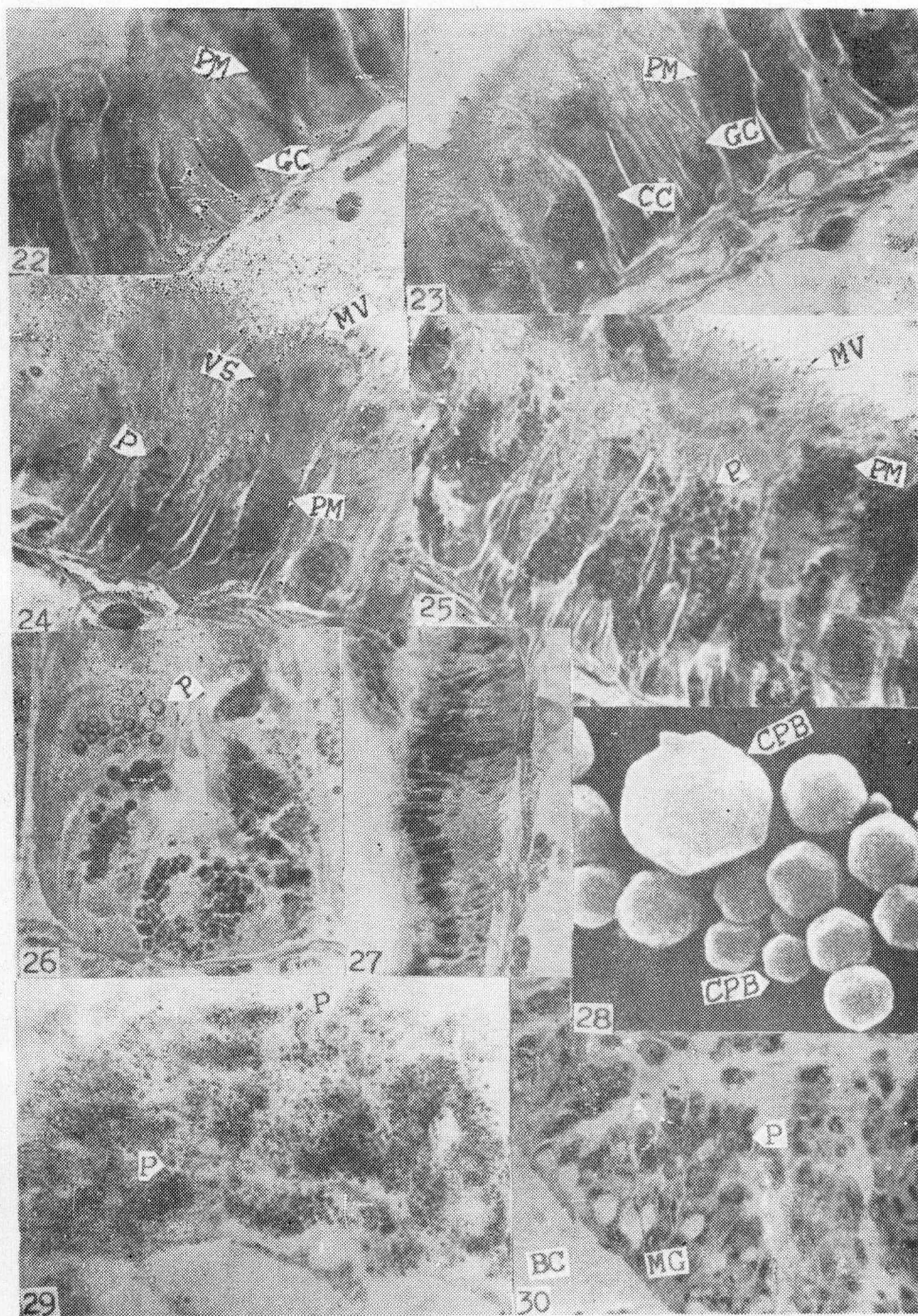
Key words: pine caterpillar; CPV; midgut; epithelial; virogenic stromata



正常幼虫组织切片(1—8)。1.体壁(BW)切片: EC为真皮细胞, T为气管, MU为肌肉; 2.背血管(DBV): HC为围心细胞, MG为中肠; 3.生殖腺(GG); 4.马氏管(MA); 5.神经节(SG); 6.神经索(GC); 7.结肠横切片: HEP为后肠上皮, RM为环肌; 8.直肠横切片: HEP为后肠上皮, I为内膜, CR为隐肾管, LM为纵肌。

感病幼虫照片(9—11)。9.尾部带白粪的病虫; 10.松毛虫病变发白的中肠(MG); 11.细胞质中的多角体(P)(超薄切片)。





22、23.多角体团块(PM)中出现小多角体, GC为杯状细胞, CC为筒状细胞, 24、25.细胞质中出现成熟的多角体, 同时也能看到VS及多角体团体; 26.不同细胞中的多角体大小不一致; 27.充满多角体的中肠; 28.成虫、蛹中肠内的质型多角体(CPB)(扫描7264×); 29.脱落在中肠腔(L)中的细胞碎片及多角体(P); 30.肠壁细胞充满多角体, 细胞严重脱落。