

DaEPV 核衣壳蛋白同时采用不连续系统 SDS-PAGE 凝胶电泳法测定结果为 7 条多肽 (图 8)。

求待测 DaEPV 蛋白的分子量,以 DaEPV 蛋白多肽的相对迁移率在标准蛋白曲线上查分子量(表 2)。

根据标准蛋白回归方程

$$y = 0.8199 - 0.0074334X$$

DaEPV-DNA 经限制性内切酶酶解分析,测出分子量为 71.77×10^6 道尔顿,与电镜展层计算,分子量为 70.46×10^6 道尔顿,结果基本一致。

DaEPV 蛋白多肽的结果,由于标准蛋白系

列的差异而不太稳定。但正如国内外许多报道的那样,蛋白和核酸生化分析在病毒分类工作中有极其重要的意义^[2-4]。

本实验对 DaEPV 蛋白和核酸理化性质的分析,为进一步研究该病毒的各种性质提供了必要的依据。

参 考 文 献

1. 樊美珍等: 杀虫微生物, 1: 140—141, 1987.
2. Keith A H et al.: Virology, 79:14—16, 1977.
3. Keith D and Summers M O; Virology, 112:190—197, 1981.
4. John O.K. et al.: Virology, 113: 381—392, 1982.

宽边小黄粉蝶颗粒体病毒的研究初报

孙 发 仁

(山东省泰安市农业科学研究所, 泰安)

摘要 宽边小黄粉蝶 (*Eurema hecabe* L.) 颗粒体病毒的包涵体平面图象多呈椭圆形, 大小约 $300-500 \times 150-300 \mu\text{m}$, 病毒粒子杆状, 两端圆滑, 微弯, 大小约 $200-250 \times 50-60 \text{nm}$, 属杆状病毒属 (*Baculovirus*) B 亚组。此株病毒对经济昆虫家蚕、柞蚕和昆虫天敌七星瓢虫无致病性。

关键词 宽边小黄粉蝶; 颗粒体病毒

宽边小黄粉蝶 (*Eurema hecabe* Linnaeus) 属鳞翅目粉蝶科 (Pieridae)。幼虫主要危害胡枝子、合欢、云实、皂荚、山扁豆、合萌和苜蓿等豆科植物^[1]。1980 年 7 月, 在泰山发现自然患病死亡的宽边小黄粉蝶幼虫, 经采集、分离鉴定, 其病原体是一种颗粒体病毒。室内经多次感染 2—4 龄的宽边小黄粉蝶幼虫, 其致死力均在 90% 以上, 且寄主专一性强, 对菜粉蝶 (*Pieris rapae* Linnaeus)、云斑粉蝶 (*Pontia daplidice* Linnaeus)、黄粉蝶 (*Colias hyale* Linnaeus)、银纹夜蛾 (*Plusia agnata* Staudinger)、甘蓝夜蛾 (*Barathra brassicae* Linnaeus)、杨毒蛾 (*Leucoma salicis* Linnaeus)、柞蚕 (*Antheraea pernyi* Guérin-Méneville)、家蚕 (*Bombyx mori* Linnaeus) 和七星瓢虫 (*Coccinella septempu-*

nctata) 9 种鳞翅目幼虫, 均未获得交叉感染。

本文着重报道该株病毒的分离和形态观察结果。

材 料 和 方 法

(一) 材料来源和保存

将从野外采回自然患病的宽边小黄粉蝶幼虫尸体捣烂, 加无菌水浸泡, 然后多层纱布过滤, 其滤液加青霉素和链霉素 (各 2000u/ml) 处理 12 小时, 对 2—3 龄宽边小黄粉蝶进行沾食感染, 收集明显表现病毒病症状的病虫保存于 50% 甘油或冰箱中。

承中国人民解放军济南军区总后勤医院电镜室协助 拍摄电镜照片, 特此致谢。

(二) 颗粒体的分离

采用低速差速离心粗提颗粒体, 即将病虫尸悬浮过滤液先用 1000r/min 离心 15—20 分钟, 弃沉淀, 上清液用 4000r/min 离心 90—120 分钟, 取沉淀再加入无菌水摇匀, 经 2000r/min 离心 10—15 分钟, 取上清液。沉淀再加入无菌水搅拌悬浮, 2000r/min 离心 15—20 分钟, 弃去沉淀物, 合并二次上清液经 4000r/min 离心 90—120 分钟, 如此重复交叉离心 2 次, 即得乳白色颗粒体沉淀, 加适量无菌水制成悬浮液, 置冰箱备用。

(三) 光学显微镜观察

取颗粒体悬液涂片风干, 用甲醛固定, 0.1% NaOH 处理 2—5 分钟, 石碳酸复红染色; 或涂片经碱性品红甲醇饱和溶液染色, 观察其着色反应。

(四) 电子显微镜观察

取颗粒体悬液滴在样品载网上, 风干后用 2% 磷钨酸 (pH7) 进行负染。病毒粒子的观察: 在有颗粒体的电镜铜网上滴加 2% NaOH 处理 2—3 分钟, 用双蒸馏水洗去碱液, 2% 磷钨酸 (pH7) 负染, 在透射电镜下观察。观察颗粒体立体图象可用扫描电镜观察。

结果与讨论

(一) 病虫症状

宽边小黄粉蝶幼虫被颗粒体病毒感染后, 在潜伏期不表现任何症状, 常温 (24—25℃) 下 3 天后表现食量减少, 行动反应均迟钝, 进而体节肿胀, 体色由绿色渐渐变至黄白色, 腹面变色呈灰白色、不透明。死虫多以尾足或腹足附着叶片倒挂。死虫体内组织解离, 体壁脆软易破, 流出灰白色的体液, 略有腥味, 与细菌感染不同, 细菌感染的虫尸和体液呈褐色或黑色, 具有强烈的腐臭味。

(二) 颗粒体的性状和形态

颗粒体不溶于水, 比水重, 静置有白色沉淀, 也不溶于乙醇、丙酮、二甲苯等有机溶剂, 但溶于 NaOH 和 Na_2CO_3 等碱性溶液。颗粒体折光性强, 在相差和暗视野显微镜下观察可见

许多闪光颗粒。颗粒体经 0.1% NaOH 溶液处理可被石炭酸复红染成红色颗粒; 涂片经碱性品红甲醇饱和溶液染成红色。在透射电镜下观察颗粒体多呈椭圆形, 扫描电镜观察呈蚕茧状, 大小约 $300-500 \times 150-300\text{nm}$, 个别颗粒体特长, 长度可达正常颗粒体 2 倍以上 (图 1, 2)。

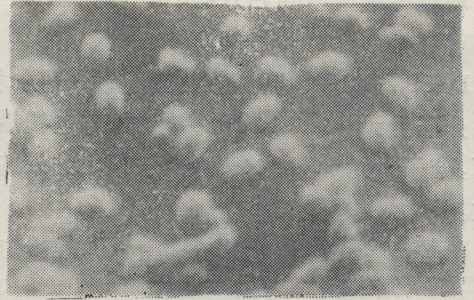


图 1 宽边小黄粉蝶颗粒体病毒包涵体的形态 (10000×)

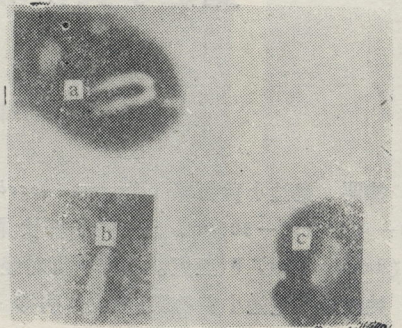


图 2 经碱解处理后的颗粒体

- a. 已释放出病毒粒子的颗粒体空壳 (18000×)
- b. 病毒粒子 (40000×)
- c. 未破坏的颗粒体

(三) 病毒粒子形态观察

颗粒体经 2% NaOH 或 0.1mol/L Na_2CO_3 处理后, 颗粒体溶解释放出病毒粒子, 病毒粒子杆状, 两端圆滑, 有的微弯, 大小约 $200-250 \times 50-60\text{nm}$ (图 2), 每个颗粒体中包含有一个病毒粒子。

根据对宽边小黄粉蝶颗粒体病毒病的病征和病毒形态观察结果, 参照国际统一的病毒分类命名系统^[2], 我们认为宽边小黄粉蝶颗粒体病毒属于杆状病毒科 (Baculoviridae) 杆状病毒属 (*Baculovirus*) B 亚组的一个成员, 定名为宽边小黄粉蝶颗粒体病毒 (*Eurema hecabe* GV),

简称 EhGV。根据 1986 年报道,世界上已知此类病毒约有 130 株,我国发现约 42 株,EhGV 尚未见报道^[3-5],有关它的生物学特性和野外试验有待进一步研究。

参 考 文 献

1. 西北农学院植保系编: 陕西省经济昆虫图志(鳞翅目: 蝶

类),陕西人民出版社,19—25,1978。

2. Fenner F: *Interirology*, 7:1—116, 1976。

3. 梁东瑞等:中国昆虫病毒图谱,湖南科学技术出版社,113—119,1986。

4. 中国科学院武汉病毒所:微生物学报,27(3): 292—295, 1987。

5. 刘岱岳:西北林学院学报,2(1): 134—153,1987。

猴头菌液体培养下的生理特性观察

石 勇 民

丁 彦 怀

马 麟 祥*

(河北承德地区轻工业公司)

(辽宁大学生物系)

(辽宁省农科院土肥所)

摘要 以猴头 (*Hericium erinaceus*) 菌株 He-1 为供试株,探讨猴头菌生理特性。实验表明,钾、镁、磷为猴头菌生长所必需。1—2ppm 的三十烷醇、1—3 ppm 的 α -萘乙酸和吲哚乙酸、80 μ g/l 的烟酸、100—1000 μ g/l 的硫胺素、40 μ g/l 的生物素分别具促进菌丝生长作用。其生长 pH 范围广,最适 pH4—5,并在不适 pH 下具自身生理调节机制。最适生长温度 25—30 $^{\circ}$ C,40 $^{\circ}$ C 抑制生长但不致死。前期定期振荡虽能促进菌丝生长,但在整个培养期定期振荡不能增加菌丝生物量。

关键词 猴头菌;液体培养;生理特性

采用国际联机文献检索得知,目前国内外对于猴头菌营养生理方面的系统研究未见报道^[1-11]。笔者对此进行了初步实验,现将结果报告如下。

材 料 与 方 法

1. 供试菌株:猴头 (*Hericium erinaceus*) 菌株辽 101,编号 He-1。

2. 培养基

(1) 斜面培养基(I):以 PDA 为基础培养基,添加 KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3g, 酵母膏 5g, 用柠檬酸调 pH5.5。

(2) 液体培养基 I:上述配方去琼脂。

(3) 液体培养基 II(%):葡萄糖 4.0, 酵母膏 0.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2, KH_2PO_4 0.1, Na_2HPO_4 0.012, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, 1% ZnSO_4 0.5ml, 柠檬酸 0.04, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03, H_3BO_3 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 各 1mg, VB_1 50 μ g, 生物素 10 μ g, 核黄素 5 μ g, 氯霉素 5000 单位。

3. 标准接种液制备:取供试菌株斜面,挑取表面菌苔接种在液体培养基 I 上,摇床振荡培养 10—12 天,无菌过滤得菌丝体,无菌水冲洗后,再用等体积生理盐水(内加玻璃珠,氯霉素 50 单位/ml)稀释摇匀,冰箱保存。

4. 无机盐、生长素和激素对 He-1 生长的影响:无机离子试验用液体培养基 II,换用无离子水,取消酵母膏,将 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 增为 0.4%, 缺磷试验将 KH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 换成 KCl 0.1%, 缺钾试验将 KH_2PO_4 换成 Na_2HPO_4 0.1%, 其它无机盐试验在培养基 II 中取消相应物质按表 1 浓度添加试验即可。培养 20 天后取出用 $\phi 100\mu\text{m}$ 滤孔坩埚过滤得菌丝体,置 70 $^{\circ}$ C 下干燥 24 小时后称干重。取平行三次重复平均值(下同)。

生长素及浓度配比试验按表 2 所列^[12],液体培养基 II 为基质,各生长素待培养基装瓶灭

* 马麟祥先生为本实验指导。