

黑点银纹夜蛾核型多角体病毒的分离和鉴定*

孙 发 仁

(山东省泰安地区农业科学研究所, 泰安)

黑点银纹夜蛾 (*Plusia nigrisigna*) 幼虫主要危害大豆和十字花科蔬菜, 豆田中银纹夜蛾、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。1979年8月, 我们从大

豆田内采集的自然患病死亡的黑点银纹夜蛾幼

* 承山东农学院植保系牟吉元副教授审定昆虫种名; 中国人民解放军济南军区总后勤医院和山东医学院电镜室拍电镜照片; 石蜡切片由本所王心钗、季敏同志制作。

虫中分离到一株多角体病毒,经鉴定是一种核型多角体病毒(简称多角体病毒)。室内试验说明,对寄主黑点银纹夜蛾幼虫有较强的感染致病力。本文报道病毒的分离鉴定结果。

材料和方法

1. 材料来源和保存:从泰安市泰山公社东关大队豆田采集自然患病虫体,经镜检确定病毒病原后,即研磨制成悬浮液并经青、链霉素处理(2000u/ml)。涂叶对3—4龄幼虫反复进行感染,取明显表现病毒病症状尚未死亡的病虫放入甘油中,置冰箱内保存。

2. 多角体病毒的分离方法:将病虫用无菌水洗涤后,捣碎并加蒸馏水浸泡,多层纱布过滤,滤液经500rpm离心3—5分钟,去除虫体残渣后再经3000rpm离心20—30分钟,弃上清液,沉淀物内加蒸馏水摇匀,反复离心洗涤4次,得初步提纯浓缩的乳白色多角体悬液粗制品。

3. 光学显微镜观察:将提纯的多角体粗制品和病虫血淋巴组织进行涂片、风干、固定。组织病理观察是把感染120小时的濒死病虫以Bouin's固定液固定,按常规石蜡切片法脱水、透明、包埋,虫体横切5—7 μ 厚。涂片和切片经1%NaOH处理1分钟后用伊红染色观察^[1],用Olympus显微照相机摄影。

4. 电镜观察:取多角体悬液滴在有支持膜(0.2% Formvar)的电镜铜网上,干燥后在透射电镜下观察多角体形态。观察病毒粒子的方法是将有多角体样品的铜网浸入0.05M Na₂CO₃和0.05M NaCl混合(10:1)液中处理20—30分钟,取出后在双蒸馏水中涮几下,干燥后用2%磷钨酸(pH7.0)负染。超薄切片的制作是将病变组织(脂肪)切成1立方毫米小块,用戊二醛和锇酸溶液双重固定,经乙醇和丙酮脱水后,环氧树脂包埋进行超薄切片,在铜网上用铅溶液和醋酸铀染色^[2],进行透射电镜观察。

结 果

(一) 病虫症状及病征

人工感染3—4龄幼虫,初期无明显变化,第三天开始表现食欲减退、反应迟钝;进而体节肿胀,由绿色渐渐变至黄白色,腹面呈乳白色,不透明。死前常爬至高处,多以腹足和尾足同时附着呈“7”形吊挂。死虫体壁极易破溃,流出黄白或乳白色粘稠体液,新鲜死虫无腐臭味。体液涂片镜检可见大量折光的多角体颗粒,(见图2)。

(二) 多角体病毒的溶解性和着色性

多角体病毒不溶于水,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和Na₂CO₃溶液。多角体病毒可被伊红、结晶紫和番红染成粉红、蓝紫色和红色,但不被苏丹III着色。用Giemsa染色多角体病毒不着色,表现了核型多角体病毒的特征。

(三) 多角体形态

电镜观察多角体病毒呈四、五、六边形,近圆形和多种不规则形,棱角钝圆,其多数直径0.75—1.25 μ (图1)。

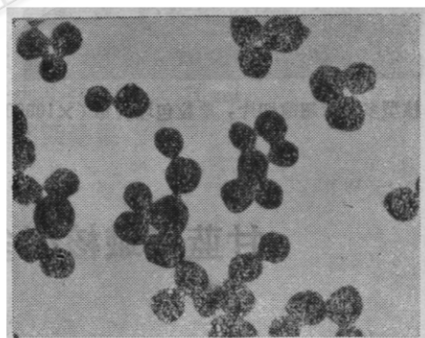


图1 黑点银纹夜蛾核型多角体形态

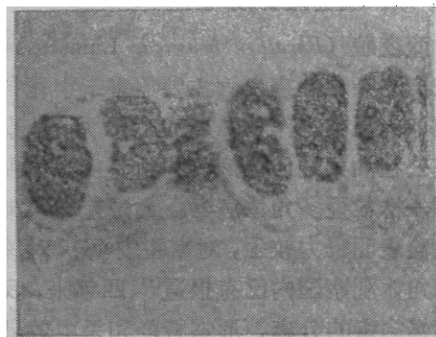


图2 核型多角体在真皮组织的细胞核中形成

(四) 病毒形态

多角体经碱处理后,可见到多角体裂解并释放出许多病毒(图2),留下多角体空膜,有的病毒还包含在多角体膜内(图3)。病毒粒子杆

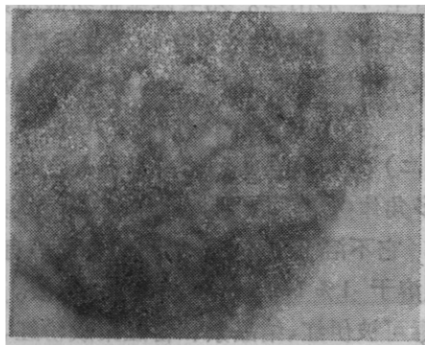


图3 核型多角体病毒形态($\times 39300$)

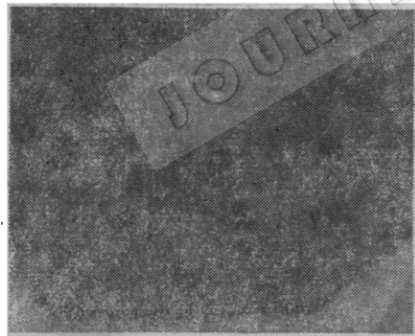


图4 核型多角体超薄切片,单粒包埋病毒($\times 100000$)

状,两端钝圆大小约 $70 \times 275\text{nm}$ 。电镜检查超薄切片,可见多角体外围有一层电子致密的多角体膜,病毒粒子被有内外两层膜,在多角体内的分布似乎无一定次序,属单粒包埋类型(图4)。

讨 论

根据上述试验结果,依据国际病毒分类和命名系统^[3],确定我们所分离的是一种核型多角体病毒,属杆状病毒科(Baculoviridae),杆状病毒属(Baculovirus)亚组A中的一个成员。据1975年报道,本类病毒已发现可感染7个目284种昆虫,其中最多为鳞翅目昆虫。在我国已发现的有粘虫、棉铃虫、斜纹夜蛾、桑毛虫核多角体病毒等30余种^[4]。有关此株病毒的生物学性质和田间试验需继续研究。

参 考 文 献

- [1] 蔡秀玉:昆虫学报,14(6): 534—540,1965。
- [2] Pease, D. C.: *Histological Techniques for Electron Microscopy*, 2nd Edition, Academic press, New York and London, 1964, 216.
- [3] Fenner, F.: *Intervirology*, 7: 1—116, 1976.
- [4] 高尚荫: 中国病毒学研究三十年, 科学技术文献出版社重庆分社, 1980年, 128—153页。