

研究报告

一株单粒包埋类型的红缘灯蛾 NPV

戴美学

(山东师范大学生物系, 济南 250014)

祖爱民

(济南教育学院生物系, 济南 250001)

摘要 发现一株新的 AINPV, 与已报道的明显不同。其多角体呈三角形, 直径 $1.0 \sim 1.24 \mu\text{m}$, 单粒包埋型, 每多角体内含 $52 \sim 78$ 个大小为 $298 \sim 375 \times 41 \sim 56 \text{ nm}$ 的病毒粒子。核衣壳大小为 $280 \sim 358 \times 36 \sim 45 \text{ nm}$ 。该病毒株具较强毒力, 以 $2 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7 \text{ PIB/ml}$ 的浓度感染 3 龄幼虫, 6d 死亡率达 $84.2 \sim 92\%$, LC_{50} 为 $1 \times 10^4 \text{ PIB/ml}$, 浓度与死亡率的回归方程为 $y = 3.28 + 0.43x$ 。

关键词 红缘灯蛾, 核型多角体病毒, 单粒包埋型病毒

红缘灯蛾核型多角体病毒 (*Amsacta lactinea* Nuclear Polyhedrosis Virus) 已有报道^[1]。1993 年 8 月作者于山东成武县城西关玉米田发现有许多红缘灯蛾幼虫液化死亡, 经染色检查证明系核型多角体病毒感染, 但多角体的形态与已报道的明显不同, 其它特征也有较大差异。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 病毒的分离提取

罹病虫尸(用原初发现的病死虫粗提液涂叶感染幼虫获得)加 0.01 mol/L pH7.0 PBS 研磨过滤, 经差速离心法粗提, 再经 $45 \sim 65\%$ (W/V) 蔗糖密度梯度离心进一步纯化。

1.2 病毒的鉴定

1.2.1 组织病理切片: 感染一定时间(24、48、72、96h)的幼虫用 Bouin-Duboscq 液固定, 常规方法切片, 按 Hamm 氏法^[2]染色, 镜检各组织病变情况并拍照。

1.2.2 病毒粒子及核衣壳制备: 按 Summers 等的方法^[3]溶解多角体制备病毒粒子。病毒粒子用 0.01 mol/L Tris (pH7.8) -0.01 mol/L EDTA 缓冲液配成浓度约为 $500 \mu\text{g}$ 蛋白/ml 的悬液, 加入终体积为 2% (V/V) 的非离子型

去污剂 NP-40, 37°C 作用 18h, 然后加 10 倍 0.01 mol/L Tris (pH7.8) -0.01 mol/L EDTA 稀释终止反应, 低温下 $24000g$ 离心 40min, 沉淀用少许双蒸水悬浮, 即得核衣壳悬液。

1.2.3 电镜观察: 纯化的多角体滴于 Formvar 膜覆盖的电镜铜网上, 干燥后上 HITACHI H-800 透射电镜观察。病毒粒子及核衣壳悬液滴铜网, 经 2% PTA 负染 1min, 透射电镜观察。多角体的超薄切片是将纯化多角体 35°C 干燥 48h, 2% 戊二醛与 2% 锇酸固定, 酒精脱水, 环氧树脂 618 包埋, LKB 超薄切片机切片, 醋酸铀与柠檬酸铅双染, 透射电镜观察拍照。

1.3 毒力的生物测定

试虫采用田间采集的 3 龄初健康红缘灯蛾幼虫; 测定方法参考 Chauthani^[4]描述的昆虫病毒生测技术略加修改。

2 结果

2.1 病征

感病幼虫初期症状不明显, 第 3 天开始厌食少动、体色变暗; 后期腹足微肿; 死虫体躯柔软、体内组织液化, 但皮层完整。

2.2 组织病变

组织病理切片显示,脂肪组织、气管基底膜细胞、中肠上皮细胞受害严重(图 1:1~3)。另外,马氏管、肌肉皮膜细胞也受到一定程度的感染。受害各组织病变主要发生在细胞核内,核

显著膨大,核内充满多角体。从组织切片还观察到,中肠上皮细胞和脂肪组织出现病变最早,感染 48h 即出现病变,气管基底膜、马氏管出现明显病变的时间比前二者晚 24h 以上。

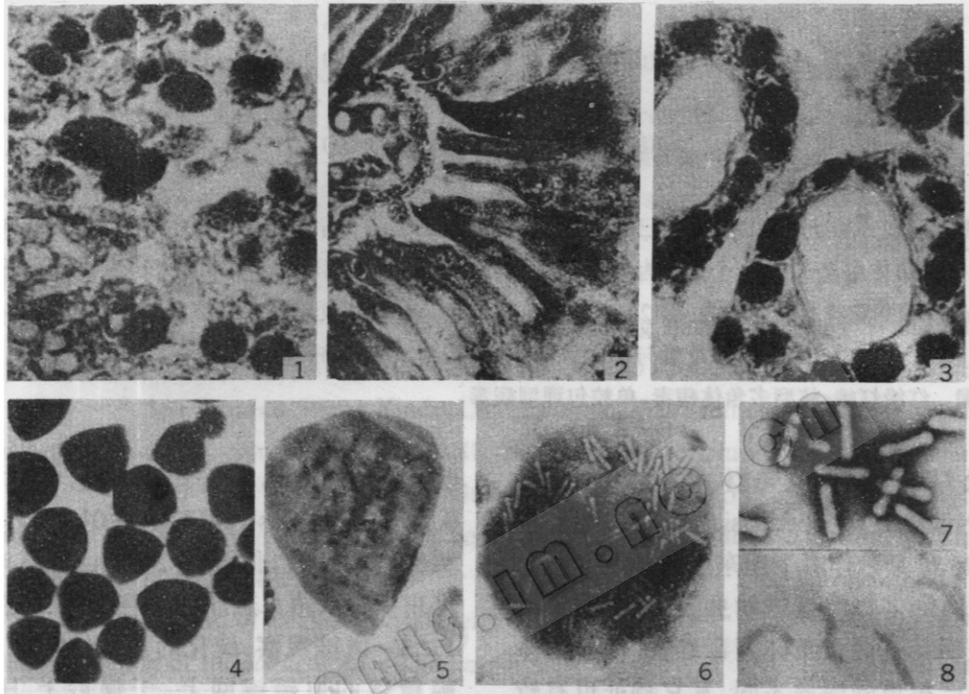


图 1 AINPV 感染的组织病变及 AINPV 多角体、病毒粒子形态

1. 被 AINPV 感染的脂肪细胞 2. 被 AINPV 感染的中肠上皮细胞 3. 被 AINPV 感染的气管皮膜细胞 4. AINPV 多角体透射电镜图($\times 8000$) 5. AINPV 多角体超薄切片($\times 20000$) 6. 经适度溶解的 AINPV 多角体($\times 20000$) 7. AINPV 的病毒粒子($\times 30000$) 8. AINPV 的核衣壳($\times 32000$)

2.3 病毒的形态、大小

多角体绝大多数呈三边形,大小较整齐,直径 $1.0\sim 1.24\mu\text{m}$ 、平均 $1.16\mu\text{m}$ 。超薄切片表明,属单粒包埋类型;从经适度碱解的样品发现每个多角体内包有 52~78 个病毒粒子;病毒粒子直杆状,两端钝圆并略膨大,大小为 $298\sim 375\times 41\sim 56\text{nm}$ 。经 NP-40 处理获得的核衣壳呈弯曲杆状,大小为 $280\sim 358\times 36\sim 45\text{nm}$,表面可见细小片状物,可能是未脱净的囊膜碎片(图 1:4~8)。

2.4 生物测定结果

将试虫分组,用 2×10^7 、 2×10^6 、 2×10^5 、 2×10^4 、 2×10^3 PIB/ml 五种浓度分别感染,6d 统计死亡率(表 1)。

表 1 说明,用 AINPV 五种浓度分别感染 3 龄幼虫,幼虫死亡率随浓度增加而上升。浓

表 1 AINPV 五种浓度感染 3 龄幼虫的死亡率

浓度 (PIB/ml)	试虫数 (个)	平均 死亡率(%)	校正 死亡率(%)	机率值
2×10^7	90	92.5	92.0	6.408
2×10^6	90	85.2	84.2	5.999
2×10^5	89	74.0	72.2	5.589
2×10^4	90	56.0	53.0	5.075
2×10^3	90	42.0	38.0	4.695
CK(D.W)	89	6.4		

设 3 次重复

度在 $2\times 10^6\sim 2\times 10^7$ PIB/ml 时,6d 死亡率可

达84.2~92%。计算病毒浓度与幼虫死亡率的直线回归方程为 $y = 3.28 + 0.43x$ ，其函数图像如图2；求得 LC_{50} 为 1×10^4 PIB/ml。

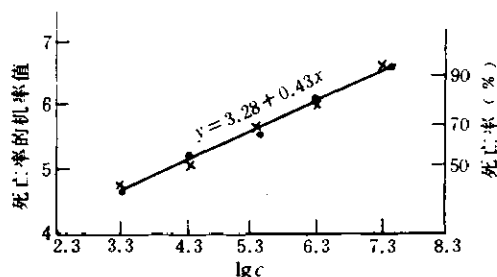


图2 AINPV 五种浓度感染3龄幼虫死亡率的回归直线

×—×: 观察值, ····: 计算值

3 讨论

本病毒株与已报道的 AINPV 在多角体形态、包埋类型方面有明显不同。已报道的 AINPV 多角体多呈四边形、大小不一、混合包埋型，每病毒束含1~6个核衣壳^[1]；本病毒株多角体绝大多数呈三角形，大小基本一致，属单粒包埋型。另外，二者在组织病理方面也表现出明显差异。已报道的 AINPV 对红缘灯蛾幼虫的脂肪体和血细胞最敏感，气管基底膜细胞、中肠上皮、肌肉组织以及马氏管均不发生病变^[1]；而本病毒株除能感染幼虫的脂肪组织外，还能引起气管基底膜细胞、中肠上皮发生严重病变，在感染后期，肌肉皮膜和马氏管也见明显病变发生。尽管不同研究者于不同地区从某种宿主分离获得不同的病毒分离株的报道已有不

少^[5~14]，但象本文报道的那样，在多角体形态、病毒包埋型及组织病理诸方面都有显著差异的尚不多见。关于两毒株间的亲缘关系及理化特性的异同，我们将作进一步研究。

生物测定结果表明，该病毒株对红缘灯蛾幼虫具有较强毒力，可望制成病毒制剂进行大田防治。

参考文献

- [1] 武汉大学病毒所主编. 中国昆虫病毒图谱, 长沙: 湖南科学技术出版社, 1986, 6.
- [2] Hamm J J. J Invertebr Pathol, 1966, 8: 125~126.
- [3] Summers M D, Smith G E. Virology, 1978, 84: 390~402.
- [4] Chauthani A R. J Invertebr Pathol, 1968, 11: 242~245.
- [5] 刘年翠, 梁东瑞, 赵崇秀, 等. 武汉大学学报(自然科学版), 1978, (4): 140~141.
- [6] 湖北省荆州地区微生物站. 微生物学通报, 1979, 6(5): 11~12.
- [7] 中国林业科学院林研所昆虫室等. 林业科技通讯, 1980, (3): 26~27.
- [8] 王志贤. 微生物学通报, 1982, 9(5): 204.
- [9] 苏德明, 乐云仙, 陈梅琴, 等. 中国林业科学, 1978, (4): 40~41.
- [10] 孙企农. 生物防治通报, 1985, 1(3): 13~15.
- [11] 陈昌洁, 王耀时, 蔺维黄. 林业科技通讯, 1983, (6): 26~28.
- [12] 朱俊庆, 彭辉银. 中国茶叶, 1984, (1): 5.
- [13] 梁东瑞, 蔡毓能, 胡远扬, 等. 湖北农业科学, 1984, (12): 22~23.
- [14] 黄健屏, 唐炜臻, 舒清焕. 中国林学院学报, 1983, 3(2): 136~140.

A STRAIN OF SINGLY EMBEDDED NPV FROM *AMSACTA LACTINEA*

Dai Meixue

(Biology Department of Shandong Normal University, Jinan 250014)

Zu Aimin

(Biology Department of Jinan Education Academy, Jinan 250001)

Abstract A new AINPV, which was obviously different from the AINPV had reported, was

discovered. The polyhedron was triangular in shape and $1.0 \sim 1.24 \mu\text{m}$ in diameter. 52~78 Virions, $298 \sim 375 \times 41 \sim 56 \text{nm}$ in size, were singly embeded in one polyhedron. The nucleocapsid was $280 \sim 358 \times 36 \sim 45 \text{nm}$ in measurement. Infecting third instar larva with the concentration of $2 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7 \text{ PIB / ml}$ for 6 days, we got a death rate of 84.2~92%, LC_{50} of $1 \times 10^4 \text{ PIB / ml}$ and the equal of $y = 3.28 + 0.43x$.

Key words *Amsacta lactinea*, Nuclear Polyhedrosis Virus, Singly Embedded Virus