

菜白蝶的一种新病毒

1. 病毒的分离、鉴定*

孙富林 马桂辉 陈明树

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

从菜白蝶罹病死亡的幼虫里,分离到两种昆虫病毒。一种是已知的颗粒体病毒;另一种是无膜的非包涵体病毒,病毒外壳呈典型的六角形,廿面对称体,粒子直径大小约 25 毫微米,衣壳由许多壳粒 (Capsomer) 构成,完整和空壳病毒粒子的外周有 12 个壳粒围绕,壳粒中空。一些病毒粒子有着明显的核心 (Core), 核心球形,直径大小约 15 毫微米。提纯的病毒经 0.01% 吖啶橙 (Acridine orange) 染色,在荧光显微镜下观察呈红色荧光。它能够单独感染,使菜白蝶幼虫致病,有很高的毒性。试验证明这株非包涵体病毒为菜白蝶的一种新病毒。

国外曾报道有关大蜡螟非包涵体病毒^[1]及鹿眼蛱蝶非包涵体病毒^[2]的研究,而从菜白蝶病幼虫体中分离非包涵体病毒,迄今在国内外尚未见报道。

本文报告菜白蝶非包涵体病毒^[3]的分离和鉴定结果。

材料和 方法

(一) 材料

菜白蝶自然发病死亡幼虫,系从武汉市郊白菜地、田间采集。

感染实验用健康菜白蝶幼虫:采自非流行病区菜地,用室内盆栽白菜饲养。

病毒分离和增殖:从患病幼虫分离获得病毒悬液,感染健康幼虫增殖病毒。

(二) 方法

病毒的分离:将自然感染病毒致死菜白蝶幼虫,按每头虫 1 毫升无菌水的比例,置研钵磨碎,纱布过滤除去虫体组织碎片,滤液经 4,000g 离心 30 分钟,弃去沉淀,取出一部分上清液(内悬浮颗粒体病毒和非包涵体病毒)储冰箱备用,编号为 M,其余上清再经 8,000g 离心 10 分钟,沉淀为颗粒体病毒,用水悬浮,置冰箱保存备用,编号为 G。

菜白蝶新病毒(非包涵体病毒)的分离提纯:将病死幼虫于水:四氯化碳(4:1)溶剂中,按每头虫 1 毫升溶剂,研钵磨碎,低速离心,除去虫体组织碎片,上清液经 8,000g 10 分钟、15,000g 60 分钟离心,弃沉淀,重将上清液离心 65,100g 180 分钟,移去上清液,沉淀用无菌水悬浮,低速离心,除去不溶物质,即得非包涵体病毒悬液,编号为 N。

电子显微镜观察:取上述方法制备的 M、G、N 病毒悬液,分别滴在火棉胶-碳膜覆盖的铜网上,3% PTA 负染,电镜观察。

吖啶橙染色:用细吸管取纯化的浓 N 悬液分别滴一滴于洁净的载玻片上,自然干燥后,用 Carnoy 溶液固定 5 分钟,再经不同浓度的乙醇处理,无菌水漂洗,再将样品玻片置于 Meilvaine 氏缓冲液处理 10 分钟,经 0.01% 吖啶橙染色 5—15 分钟。

核糖核酸酶消化:取上法固定后的样品玻片,放入含有 0.05% 核糖核酸酶的 Meilvaine 氏溶液中,37℃ 45 分钟。对照样品仅置于 Meilvaine 氏溶液中。

本文于 1979 年 9 月 18 日收到。

* 文内照片、超离心提纯由本所技术室协助,龚汉洲同志采集病幼虫样品。

脱氧核糖核酸酶消化：将经 Carnoy 液固定后的样品玻片，浸于含有 0.01% 结晶脱氧核糖核酸酶的 pH7.5 0.025M 巴比妥-0.003M 硫酸镁缓冲液中（对照样品放入不含结晶脱氧核糖核酸酶的上述缓冲液中），置 37℃ 45 分钟。经 pH4.0 Meilvaine 氏溶液浸泡 10 分钟，再进行染色。

上述处理后的样品，在蓝色光源的荧光显微镜下进行观察^[4]。

室内感染试验：将上法制备的两种悬液（M、N），分别均匀涂布于洗净晾干的白菜叶上，再将健康的 3—4 龄菜白蝶幼虫分组饥饿 4 小时后饲喂，观察感染后幼虫病症，统计死亡率。用无菌水饲喂健康幼虫作为对照。

结 果

（一）病毒的电⼦显微镜观察

在 JEM-100 电⼦显微镜下观察上法制备的三种悬液，发现 M 悬液中有大、小两种病毒粒子存在（图版 I-1）。G 悬液中有形态一致的大病毒粒子，具有典型的颗粒体病毒的特征（图版 I-2）。提纯后的 N 悬液中有小病毒粒子，其外壳呈典型六角形，无被膜，直径大小约 25 毫微米（图版 I-3），衣壳由许多壳粒构成（图版 I-6、7），在完整

的和空心的病毒粒子外周，由大约 12 个壳粒围绕（图版 I-4），壳粒中空（图版 I-6），其中有些病毒粒子具有明显的小核心，小核心直径大小约 15 毫微米，呈球形（图版 I-3）。此外，小粒子病毒外壳的 6 条边，每条边由三个壳粒构成，其中两个壳粒为两条边所共有（图版 I-7）。

（二）吖啶橙染色

经吖啶橙染色样品，在荧光显微镜蓝色光下，小病毒显示火焰红荧光，其荧光不受核糖核酸酶和媒介溶液处理的影响，但经脱氧核糖核酸酶处理以后，病毒就失去了火焰红荧光。

（三）感染试验

将 M、N 二种悬液，分别感染 3—4 龄菜白蝶幼虫，一般被感染幼虫第二天开始显病，第三、四天大量死亡。两种悬液分别感染的幼虫，其死亡率相近。两次对照组试验除死亡一头外，其余均健康化蛹成蝶（见表 1）。

（四）感染后幼虫病症

两种病毒（M 悬液）混合感染幼虫后，一般多在第二天发病，初期病虫厌食、急躁

表 1 M、N 两种悬液分组感染菜白蝶幼虫死亡情况

感染材料	组别	供 试 幼 虫*			显病死亡 时 间 (天数)	成蛹头数	死亡头数	死 亡 (%)	死亡平均 (%)
		头 数	逃跑头数	实际头数					
M 悬液	1	50	3	47	4		47	100	99.45
	2	100	3	97	5	1	96	98.9	
N 悬液	1	50	2	48	4		48	100	99.33
	2	50		50	4	1	49	98	
	3	100		100	6		100	100	
对 照	1	50		50		49	1	2	1**
	2	50		50		50	0	0	

* 供试幼虫均为 3—4 龄。
** 对照组幼虫死亡原因不明。

盲爬、继之虫体肿胀、爬行呆滞、多在 2—3 天内死亡,部分病虫倒挂于菜叶而死(图版 1-5)。感病后虫体颜色由草绿变为淡绿,皮肤脆腐,易于破裂,流出白色无臭的液体,内含大量病毒粒子。N 悬液感染幼虫后,幼虫发病、病症及死亡时间与前类同,但在发病后期,虫体不肿胀而呈萎缩形,死亡虫体多为茶褐色,间或有红色。

讨 论

根据上述研究结果,菜白蝶非包涵体病毒的毒性很强,可以单独感染,并能使 99% 的感病幼虫死亡,从被病毒感染致死的幼虫体中,能分离到与前相同的病毒粒子。实验说明,菜白蝶这株新病毒,具有不需要任何其它病毒协同 (associate),可以单独在宿主细胞内复制自己的能力。

菜白蝶非包涵体病毒的形态、结构和核酸性质与大蜡螟密核病毒极其相似,其外壳的廿面对称六角形体与 Kurstak^[5] 所报道的一致。完整的病毒粒子有一个 15 毫微米的核心, Hoggan^[6] 报道大蜡螟密核病毒也有一个 7—10 毫微米的核心, Hoggan^[6] 和 Kurstak^[7] 还发现大蜡螟密核病毒粒子外周有 12—16 个壳粒所围绕,并通过电子显微镜测出了壳粒直径为 2.5—3.5 毫微米,壳粒中空直径为 1.5 毫微米,并发现六个壳粒组成的一个等边三角形的面。实验中,我们亦观察到菜白蝶非包涵体病毒

的外壳由许多壳粒构成,其完整和空心病毒粒子外周,同样有 12 个壳粒围绕,壳粒中空。在非包涵体病毒的六条边上,每条边多由三个壳粒构成。

我们还应用了 Mayor 等人的方法,对提纯的病毒浓悬液进行吖啶橙染色,在荧光显微镜下观察有火焰红荧光,证明其核酸为单股脱氧核糖核酸,这一结果与 Tijssen 等人^[8]报道一致。

综上所述,我们所研究的病毒,在形态结构、生物学特性以及核酸性质等方面,类似大蜡螟密核病毒,按照国际病毒分类命名原则^[9],应归类于细小病毒科 (Parvoviridae) 的密(核)病毒属 (Densovirus),这种病毒在菜白蝶病虫体中为首次发现。

参 考 文 献

- [1] Meynadier, G. et al.: *Rev. Zool. Agr. Appl.*, **63**: 207—208, 1964.
- [2] Rivers, C. F. and J. F. Longworth: *J. Invert. Pathology*, **20**: 369—370, 1972.
- [3] 孙富林等: 自然杂志, **3**: 320, 1980.
- [4] Mayor, H. D. and N. O. Hill: *Virology*, **14**: 264—266, 1961.
- [5] Kurstak, E. and J. R. Côté: *C. R. Acad. Sci.*, **268**: 616—619, 1969.
- [6] Hoggan, M. D.: *Comparative Virology*, Chapter 29, Academic Press, New York, pp. 43—79, 1971.
- [7] Kurstak, E.: *Adv. Virus Res.*, **17**: 207—241, 1972.
- [8] Tijssen, P. et al.: *J. Virology*, **21**: 225—231, 1977.
- [9] Fenner, F.: *Intervirology*, **7**: 1—116, 1976.

A NEW INSECT VIRUS OF *PIERIS RAPAS* L.

I. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE VIRUS

Sun Fulin [Ma Guihui] Chen Mingshu

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

Two strains of this virus were isolated from diseased larvae of *Pieris rapas*. One of these is granulosus virus. The other one is a new non-occluded virus. The virion has nonenveloped capsid with icosahedral symmetry. Several virions were shown to have a regular hexagonal contour about 25 nm in diameter and to be composed of many capsomeres. Full and empty viral particles, with 12 capsomeres around the periphery of the

capsid were noted. In some particles, the appearance of small core has been observed which is spherical, about 15 nm in diameter. The purified virions with 0.01% acridine orange staining showed red fluorescence. The virus can cause infection alone and was highly virulent. Experiments demonstrated that the nonoccluded virus is a new virus of *Pieris rapas*.