

## 黄地老虎质型多角体病毒病的研究

丁 翠 蔡 秀 玉

(中国科学院动物研究所, 北京)

黄地老虎质型多角体病毒的多角体有两种类型: 多角形和四边形, 大小分别为 $0.6-2.7\mu$ 和 $0.7-2.8\mu$ 。病毒粒子近球形, 外壳上有管状物, 病毒粒子大小为 $50-70\text{nm}$ 。黄地老虎质型多角体的毒力较高, 用 $1 \times 10^5$ 多角体/ml 的浓度感染 3 龄幼虫, 死亡率达 93.9%。

石蜡切片观察感染 6 和 10 天的黄地老虎幼虫, 中肠柱状细胞和围食膜内都含有大量多角体。超薄切片观察感染 2、4、7 天的柱状细胞内形成病毒粒子和多角体。杯状细胞感染较柱状细胞晚。感染 4 天的围食膜内发现有带毛的游离病毒粒子。

质形多角体病毒(以下简称 CPV)属双链 RNA 病毒, 它只感染寄主的中肠上皮细胞, 并在其细胞质内形成含球状病毒粒子的多角体。

直至 1977 年国外从鳞翅目、双翅目和膜翅目昆虫中分离的 CPV 不少于 182 种<sup>[1]</sup>。根据 1976 年国际病毒命名委员会的决定把 CPV 暂时归入呼肠孤病毒科, 但是 CPV 与典型的呼肠孤病毒却有不同之处, 主要表现在它的寄主、病毒粒子形态和形成独有的包含体等特性上。本文报道的黄地老虎 (*Agrotis segetum*) CPV, 是在 1974 年室内饲养的健康黄地老虎幼虫种群中发现的。国外关于黄地老虎 CPV 的研究不多, 最早的一篇报道发表在 1956 年<sup>[2]</sup>。但对其它昆虫的 CPV 研究较多, 从病理特征到核酸片段分类都有详细论述<sup>[3,4]</sup>。除家蚕 CPV 的研究外, 我国对 CPV 的研究开始于 70 年代, 陆续发现的有棉铃虫 CPV<sup>[5]</sup>; 油松松毛虫 CPV<sup>[6]</sup>; 马尾松松毛虫 CPV<sup>[7]</sup>; 午毒蛾 CPV<sup>[8]</sup>等。与已发现的核型多角体病毒相比数量是少的, 积累的资料也有限。

本实验室多年来对黄地老虎 CPV 病作了较为详细的研究, 现把黄地老虎 CPV

的病毒形态、病理特征、病毒毒力及病毒发生等研究结果报道如下。

## 材 料 和 方 法

### (一) 材料

1. 黄地老虎虫种: 系从北京地区、天津武清县田间采回后, 本实验室传代的健康幼虫。饲养温度为 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

2. 黄地老虎 CPV: 从口服感染 CPV 致死的幼虫分离提纯获得。

### (二) 方法

1. 病毒的形态观察: 从病死幼虫中分离的多角体, 经多次差速离心获得灰白色的多角体粗制品, 再经 $25-60\%$ 蔗糖梯度离心 3 次, 得到较纯的白色多角体。将多角体配成 $1 \times 10^8$ 多角体/ml 悬液, 滴于带膜网片上, 干后铂-铱喷镀, 电子显微镜 (Hitachi-11a) 观察; 或滴于铜片上喷金, 扫描电镜 (Hitachi S-450) 观察。

2. 毒力测定: 挑选健康 3 龄幼虫, 饲喂涂抹 CPV 悬液 (浓度为 $1 \times 10^8$ 多角体/ml) 的灰菜叶, 每隔一天检查一次, 统计病死幼虫 (以致死幼虫经光学显微镜检查中肠内有多角体者计算)。对照幼虫饲喂涂水灰菜叶, 也每隔一天检查一次, 直至化蛹为止。饲养温度为 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

3. 龄期、接种浓度试验: 挑选健康的 1、3、5

本文于 1981 年 3 月 20 日收到。

龄幼虫分别饲喂涂有  $1.4 \times 10^7$ 、 $1.4 \times 10^8$ 、 $1.1 \times 10^9$  多角体/ml 的灰菜叶, 每隔 1 天检查一次, 统计病死幼虫。饲养温度为  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

#### 4. 组织病理观察

石蜡切片: 将感病后 6 和 10 天的黄地老虎幼虫和从幼虫中肠内剥离的围食膜浸于 Bouin 氏固定液内固定 72 小时后, 常规方法脱水, 包埋、切片。切片厚度  $6-7\mu$ 。伊红-苏木精染色。

超薄切片: 取感病后 2、4 和 7 天的中肠和围食膜, 用 1% 锇酸和 4% 戊二醛双固定。梯度酒精脱水后用 Epon 812 包埋。LKB 4800-2A 型切片机切片。切片厚度为  $400-600\text{\AA}$ , 切片用 2% 醋酸铀和柠檬酸铅双染, Hitachi-11A 或 JEM-100c 电子显微镜观察。

## 结果和讨论

### (一) 多角体和病毒粒子的形态特征

1 多角体: 在透射和扫描电镜下, 多角体呈不规则的多面形, 大小相差悬殊, 小到  $0.6\mu$ , 大至  $2.7\mu$  (图 1-1、2)。从图 1-1 中尚可见到多角体表面的病毒粒子。1979 年在野外采集的黄地老虎幼虫中又分离到一株 CPV, 其多角体大部分为四边形, 大小在  $0.7-2.8\mu$  之间 (图 1-3)。在超薄切片的照片上还能看到多角体的晶格 (图 1-4)。

2 病毒粒子: 病毒粒子的大小为  $50-70\text{nm}$ , 所观察到的病毒粒子具有二种形态: 六角形和近球形。呈六角形的病毒粒子可见到其内深色的圆形核酸轴心及外面的蛋白外壳, 外壳上有管状突起结构 (图 1-5), 未见突起结构上的泡状物<sup>[9]</sup>。初步观察黄地老虎 CPV 的病毒粒子与 Hasaka and Aizawa<sup>[10]</sup> 氏提出的模型基本符合。

### (二) 病症

质型多角体病是一种幼虫时期的慢性疾病, 感染质型多角体病后的幼虫, 在相当长一段时间内不表现明显的外部症状, 到罹病后期才逐渐显示虫体萎缩、行动迟缓,

食量减少等症状。濒死前, 拉出乳白色的粪便, 吐出的唾液亦为乳黄色, 经光学显微镜检查均含有大量成熟的多角体。解剖虫体可见发乳白色的中肠, 中肠颜色的变化一般发生在感染后 3—4 天内, 一开始为分散的乳糜状的白斑点, 后来白斑点越来越多, 连成一片, 才表现出乳白色中肠的外观来 (图 1-6)。白色中肠内也包含有大量成熟的多角体。此特征亦是鉴定昆虫感染质型多角体病的一个简单而可靠的方法。在中肠上皮细胞变白的同时, 中肠内侧的围食膜也发生病变。表现为厚度的增加和颜色的变化, 即由正常的深绿色变为乳白色。膜原有的坚韧性和弹性亦消失。

在相同温度条件下, 感病幼虫死亡时间与接种的病毒量和所用幼虫的虫龄有关。使用  $1.1 \times 10^8$  多角体/ml 的病毒浓度接种 1、3 和 5 龄幼虫, 死亡时间分别为 7、19 和 40 天左右, 个别感染轻的幼虫仍能化蛹、蛹或死或畸形, 即使能羽化的蛹, 其个体比正常的要小 (图 1-7)。检查羽化后成虫的蛹便, 其内含有许多多角体。

### (三) 毒力测定和龄期、接种量试验

1 毒力测定: 使用 3 龄黄地老虎健康幼虫和  $1 \times 10^8$  多角体/ml 病毒浓度测定 CPV 的毒力时发现, 虽然从感染到死亡的时间较长, 但黄地老虎 CPV 的毒力还是比较高的, 死亡率可达 93.9% (图 2)。在整个病程中, 死虫数的分布是较平缓的, 没有突出的死亡高峰, 而是在感染后 6—10 天内出现每天都有相近死虫数的平峰, 以后逐日减少。这种现象与具有明显死亡高峰的核型多角体病毒不同<sup>[11]</sup>。

2 龄期、接种浓度试验: 黄地老虎 CPV 的毒力与寄主的龄期有关, 它随龄期的增大而下降, 5 龄幼虫最低, 1 龄幼虫最高; 毒力与接种浓度的关系也较明显,  $1.1 \times 10^9$  多角体/ml 浓度接种量效果要比  $1.4 \times$

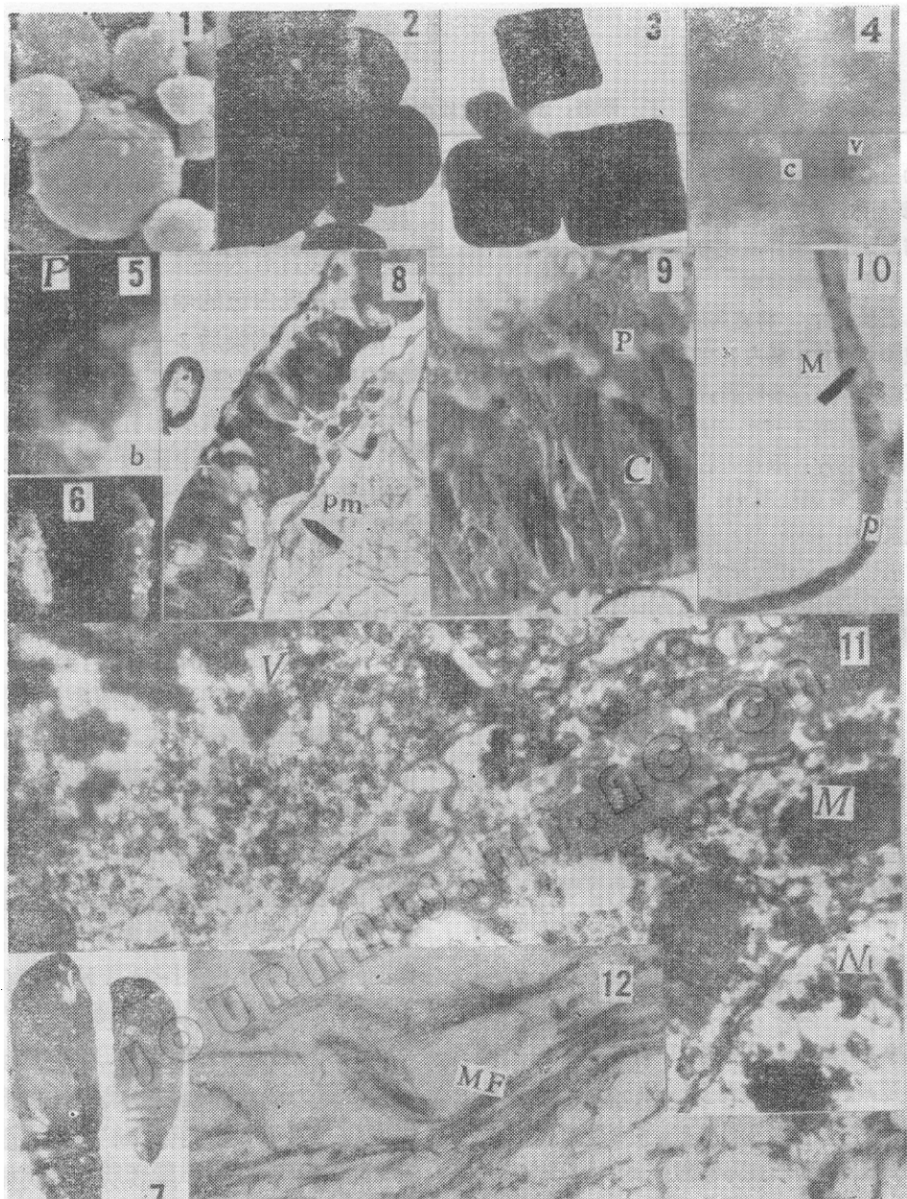


图1 多角体和病毒粒子的形态特征

Fig. 1 Morphological characterization of polyhedra and virus particles

1. 黄地老虎 CPV 的多角体(扫描电镜,  $\times 6000$ ); 2. 黄地老虎 CPV 的多角体(透射电镜,  $\times 9900$ ); 3. 黄地老虎 CPV 的另一株系, 多角体大部分为方形 ( $\times 8300$ ); 4. 黄地老虎 CPV 多角体的晶格(c), 晶格中包埋着球形病毒粒子(v)  $\times 66000$ ; 5. 病毒粒子外壳上的管状结构(b), P 为多角体; 6. 黄地老虎幼虫中肠, 右为健康的, 左为感病的; 7. 黄地老虎的蛹, 左为健康的, 右为感病的; 8. 感染 6 天的中肠横切片, 可见增厚的围食膜(pm); 9. 感染 10 天的中肠横切片, 可见散入肠腔的多角体, P 为多角体, C 为柱状细胞; 10. 感染 10 天的围食膜横切片, 可见围食膜内的多角体(p), C 为柱状细胞; 11. 感染 2 天的中肠柱状细胞超薄切片, 细胞质内已有分散的病毒粒子(v), M 为线粒体, N 为细胞核,  $\times 24750$ ; 12. 感染 4 天的围食膜, 可见其内的微纤维(mf),  $\times 18000$ 。

Fig. 1 1. The polyhedra of *Agrotis segetum* CPV, 6000 $\times$ ; (scanning micrograph) 2. The polyhedra of *Agrotis segetum* CPV, 9000 $\times$ ; (transmission micrograph) 3. The other type of *Agrotis segetum* CPV. The polyhedra are characteristically cubic in shape, 8300 $\times$ ; 4. The lattice of polyhedron (c), The virions(v) were embedded within protein lattice, 66000 $\times$ ; 5. The negative staining particles of *Agrotis segetum* There are some tubular projections (b) at outer shell of virion. P: polyhedron. 6. The midgut of larva of *Agrotis segetum*, right: healthy larva. left: infected larva. 7. The pupa of *Agrotis segetum*, left: healthy pupa right: diseased pupa. 8. The thickening peritrophic membrane (pm) have been seen in midgut cross-section on sixth day of infection. 9. A lot of polyhedra were discovered in midgut cross-section on tenth day of infection. Some polyhedra have dispersed into midgut lumen. P: polyhedron. C: columnar cell. 10. Numerous polyhedra were found in cross-section of pm on tenth day of infection. pm: peritrophic membrane. P: polyhedron. 11. The ultra-section of midgut columnar cells on second day of infection. There are many free virions (v) in cytoplasm of epithelial cell. M: mitochondrion. N: nucleus. 24750 $\times$ . 12. The ultrathin section of pm showing the structure of microfibre (mf) on the fourth day of infection. © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

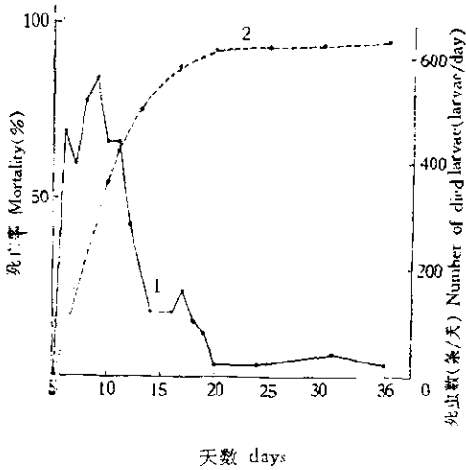


图2 黄地老虎 CPV 的毒力测定

Fig. 2 Toxicity of *Agrotis segetum* CPV

1. 死虫数 The number of died larvae;  
2. 死亡率 Mortality

$10^7$  多角体/ml 的好。唯一不足的是无论那一个浓度, 从接种到死亡的时间都较长。

#### (四) 组织病理

1 石蜡切片: 图 1-8、9 为感染 6 和 10 天的中肠组织的横切片, 可以看到中肠柱状细胞质内含大量成熟的多角体, 图 1-9 中的多角体已经释放进入肠腔。杯状细胞的感染一般较柱状细胞晚, 接种后 4 天似乎只能看到柱状细胞的感染。肠壁内侧的围食膜明显增厚(图 1-8 箭头), 其内含有多角体, 这可以从围食膜横切片上清楚地看到(图 1-10)。

2 超薄切片: 中肠细胞病变: 在感染 2 天的中肠柱状细胞内只能看到正在形成的病毒粒子(图 1-11), 未发现多角体; 感染 4 天的柱状细胞内则可找到已经成熟的完整多角体(图版 I-1)。Granados<sup>[12]</sup>等证实 *Trichoplusia ni* 的 CPV 在 *T. ni* 细胞株上只需要 48 小时就能形成多角体, 比我们在体内发现多角体的时间要短。原因可能是口服感染的方法不太适宜更精确地掌握好病毒复制的时间, 如改用注射方法也许会取

得较好的效果。感染 7 天的柱状细胞不但含有众多成熟的多角体而且还有数量极多的病毒粒子包围在多角体外(图版 I-2), 这些病毒粒子可能不再被包埋到多角体内而成为游离的病毒粒子, 进入其它未被感染的中肠细胞中重新复制形成新的多角体。Payne and Kalmakoff 认为多角体内和其外的病毒粒子在结构和功能上无明显区别<sup>[13]</sup>。但是高达病毒总数 70% 的游离病毒粒子却起着继续感染相邻细胞的作用。这个结论与我们观察到的情况似乎是一致的。在柱状细胞被大量感染时, 杯状细胞亦被感染(图版 I-3), 只是其内所含的多角体数量较少。在整个感染过程中, 中肠细胞核的变化不大, 核膜和核质部分基本正常。细胞质内的线粒体在病毒粒子形成的附近变圆变大(图版 I-4), 核糖体数量也增多。这也许与病毒复制所需要的能量和蛋白有关<sup>[14]</sup>。

从(图版 II-1)中可清楚地看到病毒多角体在中肠细胞内的形成过程: 即先在细胞质内形成许多排列整齐和具有一定间隔的病毒粒子, 接着在病毒粒子之间堆积多角体蛋白, 蛋白质由内向外扩展, 把病毒粒子逐个包埋在其内, 最后形成完整的多角体。(图版 II-2)为正常黄地老虎幼虫中肠柱状细胞的超微结构相片。

围食膜病变: 关于围食膜正常的超微结构, 自 50 年代起就有人研究<sup>[15]</sup>。但由于使用的技术有限, 对其网状结构的真实性仍无法肯定。1978 年 Brandt<sup>[16]</sup>等人结合冰冻刻蚀、电子扫描等方法证实黄杉毒蛾(*Orgyia pseudotsugata*) 幼虫围食膜分为三层: 第一层称微纤维层(microfibrillar layer), 由包埋在颗粒基质内和按一定方向排列的微纤维组成, 其成分主要是几丁质; 第二层为粗糙层, 包括许多直径为 100nm 的大颗粒层和其上覆盖着的直径为 32nm

的小颗粒层;第三层为透明层,含有极细的小颗粒,表面光滑紧贴中肠内壁。三层厚度为  $1\mu$ 。没有发现围食膜上有病原可以通过的小孔<sup>[17]</sup>。我们从感染的围食膜定位和不定位的照片上可找到 Brandt<sup>[16]</sup>所说的微纤维(图 1-12)和类似于腺体和酶类的结构(图版 II-3)。感染 4 天的围食膜内已开始形成多角体(图版 I-5),多角体的周缘还留有许多未被包入的病毒粒子,病毒粒子的排列和形态似乎和中肠内的不同。一是病毒粒子聚集在一起;二是病毒粒子带毛(图版 II-4)。在多角体的边缘还可见到这种带毛病毒粒子正被包入的情况(图版 II-5)。这种现象在其它昆虫 CPV 的研究中尚未见到,围食膜内病毒粒子带毛的原因目前尚不清楚。从病毒必须在活寄主细胞内复制的特点看,围食膜作为非细胞结构,独立形成多角体的可能性应该是不存在的,但鉴于它与中肠细胞间的紧密关系,但在中肠细胞内复制的成熟病毒粒子,能否通过消化液的输送而进入围食膜,在围食膜内形成多角体?虽然有关围食膜内形成多角体蛋白质的分子生物学的依据目前还无法获得,但是在感染 7 天的围食膜内似乎可以找到许多正在包埋病毒粒子的多角体(图版 II-3),此现象似可给上述推论提供一些形态学上的根据,但为深入了解多角体蛋白是否能在围食膜内合成的问

题,还必须进行黄地老虎 CPV 的分子生物学水平的研究。

## 参 考 文 献

- [1] Martignoni, M. B. and P. J. Iwai: USDA Forest Service General Technical Report PNW-40, 1—28, 1977.
- [2] Samith, K. M.: *Agriculture*, 63: 271—275, 1956—1957.
- [3] Stair, H. A. et al.: *J. Invertebr. Pathol.*, 12: 359—365, 1968.
- [4] Payne, C. C. and C. F. River: *J. Gen. Virol.*, 33: 71—85, 1976.
- [5] 苏德明等: 复旦大学学报, 1978 年, 第 1 期, 74—78 页。
- [6] 张敬民、段飞: 林业科学, 15(3): 163—170, 1979.
- [7] 中山大学生物系昆虫学专业等: 中山大学学报, 1976 年, 第 3 期, 11 页。
- [8] 中国林科院林研所昆虫室等: 林业科技通讯, 1980 年, 第 3 期, 26 页。
- [9] Asai, J. et al.: *J. Invertebr. Pathol.*, 19: 279—280, 1972.
- [10] Hosaka, Y. et al.: *J. Insect. Pathol.*, 6: 53—77, 1964.
- [11] 黄冠辉、丁翠: 昆虫学报, 18(1): 17—23, 1975.
- [12] Granados, R. R.: *Adv. Virus Res.*, 20: 205—227, 1976.
- [13] Payne, C. C. and J. Kalmakoff: *Inter-virology*, 4: 354—364, 1975.
- [14] Arnott, H. J. et al.: *J. Ultrastruct. Res.*, 24: 479—507, 1968.
- [15] Mercer, E. H. and M. F. Day: *Biol. Bull.*, 103: 384—394, 1952.
- [16] Brandt, C. R. et al.: *J. Invertebr. Pathol.*, 32: 12—24, 1978.
- [17] Peters, W.: *Z. Morphol. Tiere.*, 64: 21—58, 1969.

## STUDIES ON CYTOPLASMIC POLYHEDROSIS OF THE TURNIP MOTH, *AGROTIS SEGETUM*

Ding Cui Cai Xiuyu

(*Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing*)

This paper gives experimental results of cytoplasmic-polyhedrosis of the turnip moth, *Agrotis segetum* (Schifferrmüller). Two types of polyhedra, one polygonal and the other tetrahedral, were observed. The size of the two polyhedra ranged from 0.7—2.8 $\mu$  and 0.8—2.7 $\mu$  respectively. The virion was nearly spherical, 50—70 nm in diameter, and with tubular structure.

The infected larvae showed reduced body size and lost appetite. The excreted feces became milky white in later stage. The midgut and peritrophic membrane (pm) became milky white also. When a piece of midgut and PM were taken, and observed under microscope, many polyhedra were found. Some infected larvae could pupate, but

the pupae were smaller than the healthy ones. The mortality of the 3rd instar with a concentration of  $1 \times 10^8$  PIB/ml was 93.9%. The experiments showed that the mortality rate depended on the concentrations of the virus and larval instars.

In paraffin sections numerous polyhedra were observed in the cylindrical cells and PM of the larval midgut on the 6th, 10th days of infection. In ultra thin sections the cylindrical cells and the goblet cell were infected on the 2nd, 4th, 7th days after inoculation. The virions with hair was found in infected PM in 4th day of infection. When the virion with hair was embedded into the polyhedra, the hair of virions remained intact.