

乌柏金带蛾核型多角体病毒的分离、提纯及生物学特性的研究

戴彩云 郑茂材

(贵州省茶叶科学研究所, 湄潭)

汤显春 杨明辉 罗怡珊 孙富林

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

乌柏金带蛾 (*Ectophasia sapivora* Yang) 属鳞翅目带蛾科^[1]。它对茶叶危害最为严重。幼虫暴发时, 将茶叶叶片全部吃尽, 仅留叶柄, 严重影响茶叶的产量和质量。

1985 年 12 月, 我们在湄潭地区首次发现自然罹病死亡的乌柏金带蛾幼虫。经采集、分离纯化, 形态观察以及生物学特性的研究。根据国际的统一病毒分类命名系统^[2,3], 该病毒应为杆状病毒科 (Baculoviridae) 杆状病毒属 (*Baculovirus*) 核型多角体病毒 (简称 EcNPV)。从乌柏金带蛾病虫尸体中分离出核型多角体病毒, 迄今国内外尚未见报道。

材料与方 法

(一) 病毒的分离纯化

将采集的乌柏金带蛾自然罹病死亡的虫尸加适量无菌水研磨, 4 层纱布过滤, 滤液经低速差速离心 3—4 次, 得灰白色的沉淀物, 即为多角体病毒。再经 45—65% 蔗糖梯度离心 4,000 r/min 2h, 可形成数条沉淀带, 收集 50—55% 的灰白色多角体带, 用无菌水洗 3 次除去蔗糖, 弃渣后加 1% SDS 处理 30 min, 用无菌水洗 2—3 次, 即得较纯的多角体, 制样滴铜网, 置电镜下观察。

(二) 病毒粒子的释放、提纯及电镜观察

取蔗糖梯度处理后的纯净多角体, 加等体积的碱液 (0.05 mol/L Na_2CO_3 -0.05 mol/L NaCl , pH 10.8) 混匀。37℃ 水浴降解 10 min, 加 1 mol/L HCl 调 pH 至 7.5 左右, 4,000 r/min 离心 20 min, 取上清液置 8,000 r/min 高速离心 40 min。再取上清液置 18,000 r/min 离心 60 min, 取沉淀 (即病毒粒子) 加适量无菌水稀释直接滴样在火棉胶-碳膜铜网上, 3% PTA 染色 5 min, 置电镜下

观察。

(三) 感染试验

用瓶栽法将茶叶枝插在瓶内, 瓶内装水, 配制一定浓度的多角体悬液, 均匀喷雾在室内瓶栽茶枝上。晾干后, 接种从野外采集并饥饿 10—12h 的健康幼虫。为防止幼虫逃跑, 将茶枝瓶放在幼笼内, 笼外用纱布扎封。并用无菌水喷茶枝喂健康同龄幼虫作对照。试验在室温 28℃ 左右进行。

(四) 不同浓度核型多角体病毒对乌柏金带蛾幼虫的生物学测定

配制 400、4,000、40,000、400,000 和 4,000,000 PIB/ml 5 种不同浓度喂养同龄期幼虫。观察计算死亡率和半致死浓度, 用清水作对照。

(五) 检测乌柏金带蛾各龄幼虫多角体病毒含量

将纯净多角体病毒按一定量喂养各龄幼虫, 各龄分 3 组, 并设对照。死亡后分别收集典型感病死亡虫尸, 研磨过滤, 离心, 提取纯净的多角体病毒。用血球计数法计算, 按一定的稀释倍数将多角体稀释, 用血球计数板置显微镜下计算, 按公式算出各龄幼虫含多角体病毒的数量 (亿 PIB/头)。

结 果 与 讨 论

(一) 多角体病毒的形态及大小

在光学显微镜下, 多角体折光性强, 发亮, 被伊红染成红色。在电镜下多角体呈三角形、4—6 边形等多种形状, 大小差异较大, 平均为 1.33 μm

本文于 1987 年 11 月 9 日收到。

承本所电镜室王学兰同志协助拍摄照片, 特此致谢。

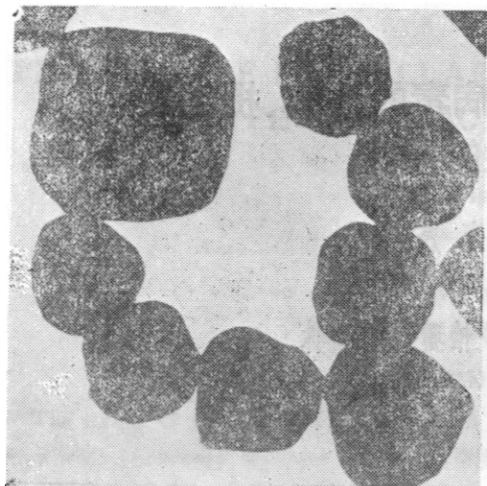


图1 乌柏金带蛾核型多角体病毒的形态
(53,000×)

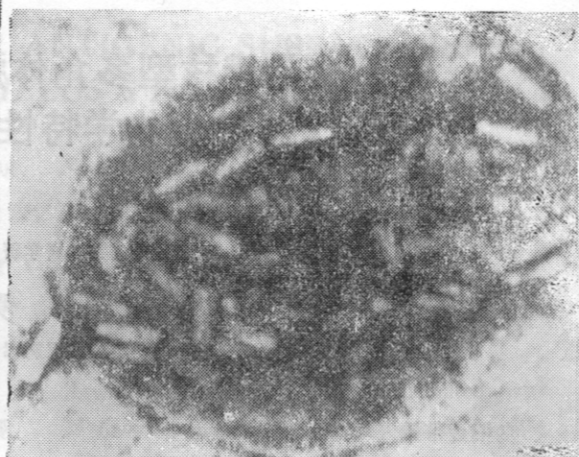


图2 乌柏金带蛾核型多角体病毒体膜内
存的病毒粒子 (10,000×)

(图1), 与大多数报道的杆状病毒多角体的大小相似^[2]。

(二) 病毒粒子及形态

多角体经碱解后, 在体膜内存在许多病毒粒子(图2)。释放出的病毒粒子呈杆状, 两端钝圆, 大小约为 $338.8 \times 85.5 \text{ nm}$ (图3)。此病毒在电镜下观察为多粒包埋, 即两个以上病毒粒子在同一束内, 包埋于多角体(图4)。

(三) 多角体病毒感染乌柏金带蛾幼虫病症

用纯净的多角体悬液, 室内感染3龄幼虫, 取核型多角体悬液喷洒于人工培植的茶叶上饲养幼虫, 第四天开始发病。其症状为食量减少, 行动迟缓, 发育减慢, 体节明显肿胀, 虫体颜色由深变浅。最后幼虫爬在茶枝顶上倒挂而死。死虫体一触即

破, 流出灰白色脓液, 无臭味。经伊红染色, 置电镜下可见大量多角体病毒颗粒。

(四) 不同浓度多角体对3龄幼虫感染性测定

取健康的, 饥饿10—12h 3龄幼虫。用不同

表1 不同浓度多角体病毒对3龄幼虫感染性测定

组别	病毒浓度 PIB/ml	供试幼虫 (头)	死亡虫数 (头)	死亡率 (%)	校正死亡率 (%)
1	400	132	76	57.58	47.48
2	4,000	126	86	68.25	60.6
3	40,000	126	103	81.71	77.40
4	400,000	130	119	91.54	89.53
5	4,000,000	133	131	98.50	98.14
对照		130	25	19.23	



图3 乌柏金带蛾核型多角体病毒粒子 (1,000×)

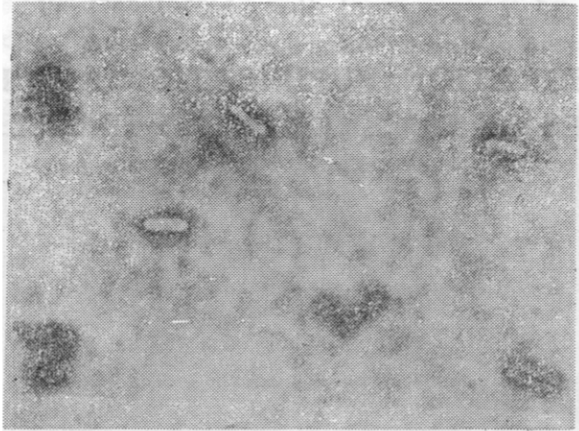


图 4 电镜下观察到的乌柏金带蛾核型多角体病毒粒子为多粒包埋 (65,000X)

浓度多角体病毒进行感染,结果见表 1。

从表 1 可看出,多角体病毒随其浓度的增加,死亡率也随之提高,死亡速度也加快。

回归方程: $y = 3.7912 + 0.485x$

校对方程: $y = 3.4259 + 0.529x$

方程标准差: s_{yx} 为 ± 0.1707

校对方程的 s_{yx} 为 ± 0.2078

$x^2 = 88.5738$

校正半致死浓度为 $Lc50 = 954.4(PIB/ml)$

供试幼虫体重和龄期是影响试验结果的重要因素。Daoust 和 Roomé 在 1974 年就指出,病毒的感染力随虫龄、体重的增加而下降^[3,4]。因此在选用虫龄时必须考虑幼虫的体重。

生物测定中必须考虑所有用具及感染室的消毒问题,否则会造成污染,影响实验结果。以上实验证明了该病毒的分类位置及制备杀虫剂时的最佳浓度。

(五) 乌柏金带蛾各龄幼虫感染后多角体病毒含量的测定

从表 2 结果看出,多角体病毒的含量随虫龄

增大,病毒含量也随之提高。反之死亡速度也延迟 2d 以上。

表 2 乌柏金带蛾各龄幼虫感染后的多角体病毒含量

虫龄	多角体病毒含量 (PIB/头)
2	6.85×10^4
3	2.1×10^5
4	3.9×10^5
5	8.2×10^5
6	14.1×10^{10}

参 考 文 献

[1] 中国科学院动物研究所: 中国蛾类图鉴, 1—IV, 科学出版社, 北京, 1981。
[2] 吕鸿声: 昆虫病毒与昆虫病毒病, 科学出版社, 北京, 1982。
[3] Daoust, R. A.: *J. Invertebr. Pathol.*, 23: 400, 1974。
[4] Daoust, R. A. et al.: *ibid.*, 23: 218, 1974。
[5] Fenner, F.: *Intervirology*, 7: 1—116, 1976。
[6] Matthews, R. E. F.: *ibid.*, 12: 129—296, 1979。

STUDY ON ISOLATION, PURIFICATION AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS OF *ECPTEROTE SAPIVORA*

Dai Caiyun Zheng Maocai

(Institute of Tea, Guizhou Province, Meitan)

Tang Xianchun Yang Minghui Luo Yishan Sun Fulin

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

A nuclear polyhedrosis virus was isolated from natural death larva of *Ecpterote sapivora* Yang. By studying of isolation, purification, morphology observation and biological properties, we found that the virus belongs to baculovirusidae *Baculovirus*.

Key words

Ecpterote sapivora; Nuclear polyhedrosis; Health larva