维普资讯 http://www.cqvip.com

第6卷第4期
1991年11月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

Vol.6 No.4
Dec. 1991

栗黄枯叶蛾核型多角体病毒的分离与鉴定

杨志荣 刘世贵 伍铁桥 石 林

（四川大学生物工程系，成都 610064）

提 要

栗黄枯叶蛾（Trabala vishnou Lefebure）属卷叶蛾属，危害10多种果树和林木花卉。1989年我们从四川大学校园内自然罹病死亡的大量栗黄枯叶蛾幼虫中，分离到一种栗黄枯叶蛾病原物。经纯化后，通过感染试验，涂片染色，电镜形态观察，超微结构研究，组织病理研究等，确认该病原物为一种核型多角体病毒。

关键词：栗黄枯叶蛾 核型多角体病毒 形态观察 超微结构 组织病理

栗黄枯叶蛾（Trabala vishnou Lefebure）属卷叶蛾属[1]。主要危害栎类、悬铃木、苹果、月季花等10多种果树和林木花卉。该虫分布于我国南方大部分省市。幼虫5—7龄，以卵越冬，一年发生1至2代，呈周期性大发生。1989年，我们在四川大学校园内发现大量自然罹病死亡的栗黄枯叶蛾幼虫。用虫尸分离物回复感染健康栗黄枯叶蛾幼虫，获得与自然罹病幼虫一样病症的病虫，将虫尸体液涂片经伊红染色在光学显微镜下检查，发现病虫体液中含有大量的多角体颗粒，故认为该病原物为一种核型多角体病毒。

材 料 和 方 法

一、多角体的纯化和形态观察[2] 将自然罹病死亡的栗黄枯叶蛾幼虫虫尸加入适量的PBS（pH7.2）研磨后过滤，滤液经数次800r/m与4500r/m交替离心及40—60%（W/W）蔗糖梯度离心，获得纯多角体。取一滴多角体悬液加到扫描电镜的载物台上，真空干燥和喷镀后在电镜下观察多角体形态。

二、病毒粒子的制备和形态观察[2] 取100mg纯多角体加入等体积0.2mol/L Na_2CO_3-0.17mol/L NaCl，pH10.8的混合液，37℃水浴中降解15分钟，调pH至7.5，6500r/m—20000r/m交替离心后取一滴病毒粒子悬液滴于100目铜网上，磷钨酸负染，在电镜下观察病毒粒子的形态。

三、多角体的超微结构观察[3] 将纯多角体经戊二醛和锇酸双固定后，丙酮脱水，包埋、超薄切片，切片捞于铜网上，磷钨酸负染后电镜下观察。

四、组织病理观察[4] 将浓度为10^6PIB/ml的多角体悬液涂于洗净凉干的悬铃木叶子上，

本文于1990年11月17日收到，1991年3月14日修回

维普资讯 http://www.cqvip.com

添食栗黄枯叶蛾幼虫，定时取样固定，石蜡包埋和切片，Hamm氏染色后在光镜下观察。

结　果

一、病症　栗黄枯叶蛾幼虫感染病毒后，食欲下降，到处乱爬，行动无目的性，体毛脱落，体节肿胀，腹部体色由黄渐变为淡黄或灰白。病死虫多呈"V"字形或"口袋状"倒悬于树干基部或周围建筑物下部。死虫体壁易破，流出微黄色脓液，无臭味。脓液涂片用伊红染色后在光镜下呈深红色，大多数多角体颗粒呈三角形、四边形或近似球形。

二、多角体和病毒粒子的形态　在电镜下多角体的平面图象呈不规则的三角形、四边形、五边形、多边形或近似于球形（图版Ⅶ 1），多角体的立体图象均为不规则的多面体或近似于球形，表面不光滑，多数表面可见明显的"沟状"，有的可见乳突或凹状（图版Ⅶ 2）。其直径为0.95—3.0微米，平均直径为1.8微米。游离的病毒粒子在电镜下呈直杆状，有的稍弯曲，其平均大小为296×98nm（图版Ⅶ 4）。

三、多角体的超微结构　一个多角体内含有数十个杆状的病毒粒子，病毒粒子有的单个存在，但大多数以二个、三个或四个病毒粒子成束随机分布于多角体内，属多粒包埋型，病毒粒子的平均大小为310×73nm（图版Ⅶ 3）。

四、病毒侵染部位　组织病理观察结果表明，该病毒主要侵染栗黄枯叶蛾幼虫的血细胞、脂肪体、表皮层、气管管壁细胞等多种组织。在感染48小时后可以看到表皮细胞、脂肪体和血细胞等发生明显病变，96小时后上述细胞核膨大，染色质明显扩散，核内出现多角体。

讨　论

1989年从四川大学校园自然罹病死亡的栗黄枯叶蛾幼虫尸体中分离的多角体病毒，从感染症状，病毒侵染部位，多角体在核中形成，伊红染色为深红色，病毒粒子为杆状等一系列结果，参照国际病毒分类和命名系统[5]，这株病毒属于无脊椎动物病毒中的杆状病毒属于（Baculovirus A）亚组（Baculovirus subgroup A）的一个种，定命为栗黄枯叶蛾核型多角体病毒（Trabala vishnou Nuclear Polyhedrosis Virus, TvNPV）。

参 考 文 献

〔1〕梁志超，1976，林业科技通讯，2：15—6。
〔2〕刘世贵等，1984，四川大学学报（自然科学版），1：104—108。
〔3〕戴华生等，1983，新实验病毒学，中国学术出版社。
〔4〕刘德明等，1984，四川大学学报（自然科学版），4：94—97。
〔5〕Frank Tenner., 1976, Classification and Nomenclature of Viruses.

维普资讯 http://www.cqvip.com

Isolation and Identification of Trabala vishnou Lefebure Nuclear Polyhedrosis Virus (TvNPV)

Yang Zhi-rong Liu Shi-gui Wu Tie-qiao Shi Lin

(*Institute of Biotechnology of Sichuan University, Chengdu, 610064*)

Trabala vishnou Lefebure belongs to Tortricidae. They are harmful to more than 10 kinds of fruit trees, woods, and flowers. We isolated and purified a kind of pathogen from naturally dead larvae of Trabala vishnou Lefebure in Sichuan University in 1989. Through infection test, dyeing observation, shape observation in electron microscope, ultrastructural and pathological study, the results show that the pathogen of Trabala vishnou Lefebure is a kind of Nuclear Polyhedrosis Virus.

Key words: Trabala vishnou Lefebure Nuclear Polyhedrosis Virus Shape observation Ultrastructural observation Pathological study

维普资讯 http://www.cqvip.com

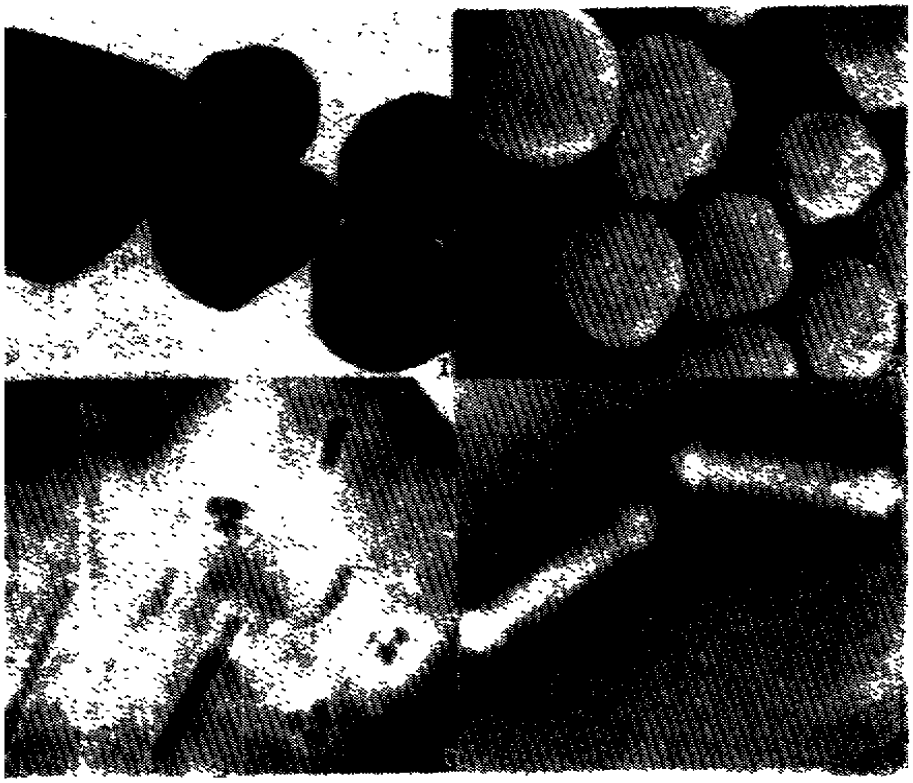

图1 栗黄枯叶蛾核型多角体病毒包涵体病毒的立体图象

Fig.1 Solid photograph of Inclusion body of TvNPV

图2 栗黄枯叶虫核型多角病毒包涵体

Fig.2 Inclusion body of TvNPV,

图3 多角体超薄切片电镜照片，显示病毒粒子形态

Fig.3 Electron microscope photogrsph of superthin section of TvNPV, showed the shape of virion

维普资讯 http://www.cqvip.com

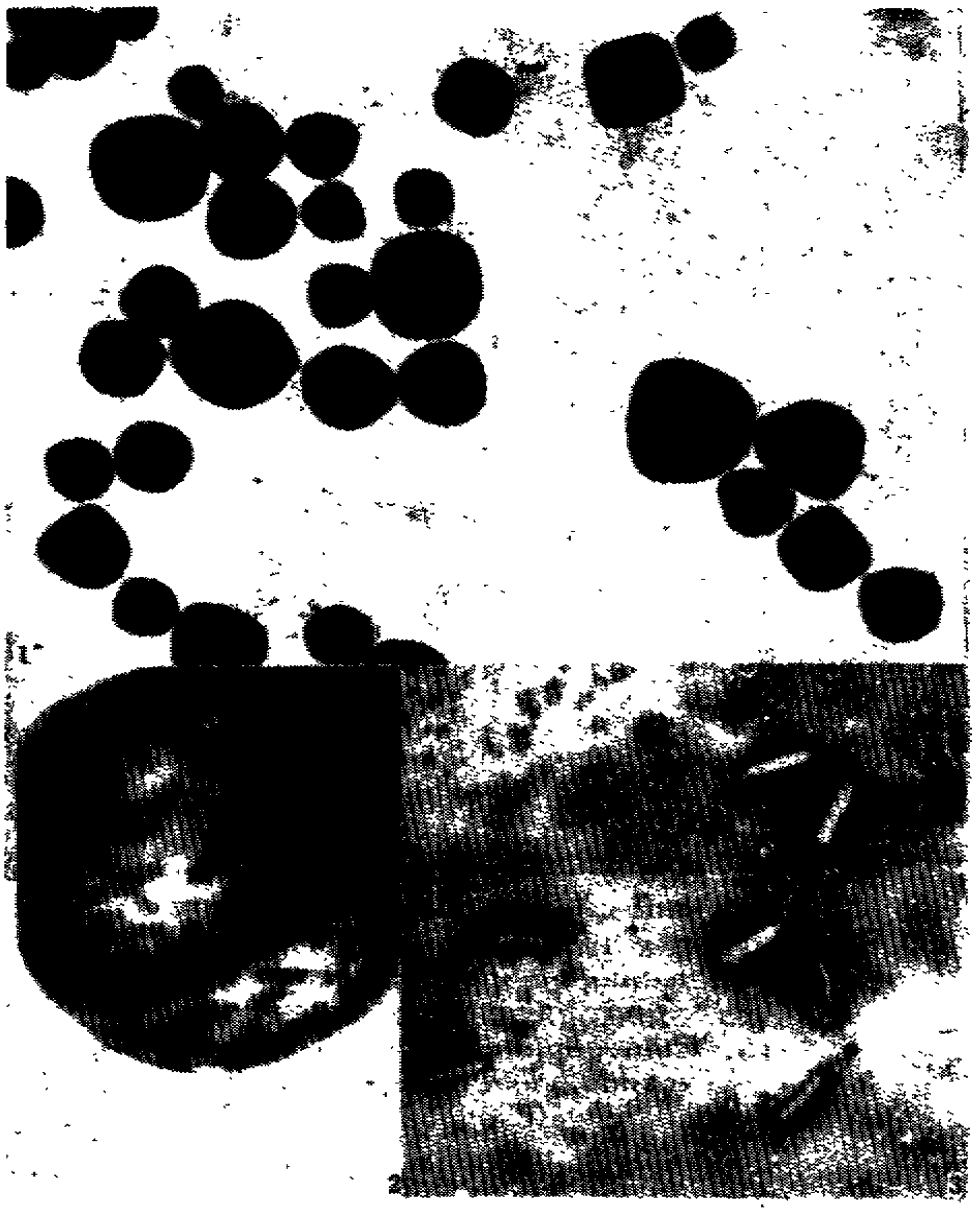

图1 蜀柏毒蛾核型多角体病毒包体涵 6600×
图2 蜀柏毒蛾核型多角体病毒包涵体碱解 34000×
图3 蜀柏毒蛾核型多角体病毒粒子 20000×
Fig.1 Paroceneria orient nuclear polyhedrosis virus inclusion bodies 6600×
Fig.2 Alkali-dissoluted PoNPV inclusion body 34000×
Fig.3 Virion of PoNPV 20000×