维普资讯 http://www.cqvip.com

138－143

15969(8)

第11卷第2期 中国病毒学 Vol.11 No.2
1996年6月 VIROLOGICA SINICA Jun. 1996

山楂粉蝶NPV的形态发生及其宿主细胞器的超微病理变化

柴一新 张立人
（中国科学院武汉病毒研究所，武汉 430071）
李淑琴 张力军
（内蒙古园艺科学研究所，呼和浩特 010010）

Q965.8

A

提要 应用电子显微技术，对山楂粉蝶核型多角体病毒感染三龄幼虫后，该病毒在体内的形态发生过程及其宿主细胞病理超微结构的变化等进行了观察与分析。结果表明：病毒感染72－168 h后，山楂粉蝶幼虫中肠上皮细胞内出现病毒发生基质、核衣壳、套膜、丝状纤维或称前多角体蛋白、病毒粒子、病毒束，以及病毒束嵌入多角体蛋白，装配成完全的病毒多角体。在相应的中肠上皮细胞内，细胞器如线粒体、粗面内质网、核糖体、溶酶体等均发生显著的病理变化。同时还应指出的是内质网呈指纹图谱型，板层体与示髓样小体等膜状结构的病理变化比较特殊。

关键词 山楂粉蝶核型多角体病毒，形态发生，细胞器，超微结构，病理变化

昆虫病毒

山楂粉蝶幼虫是我国北方果树的重要害虫之一。近几年来在东北、内蒙古一带危害猖獗。山楂粉蝶核型多角体病毒（*Aporid crataegi* Nuclear Polyhedrosis Virus，简称AcrNPV）可使山楂粉蝶幼虫感染发病死亡。Bergold于1963年首次报道这种病毒，但未作进一步研究[1]，李淑琴等首次在我国内蒙古中部地区分离出该病毒[2]，其后国内一些学者对该病毒的一些生物学性质如毒力测定、宿主范围、田间防治、形态结构与生化特性等均作了研究[3,4]。但该病毒在形态发生与细胞超微病理方面的工作仍无报道。本文应用电子显微技术，对山楂粉蝶核型多角体病毒在宿主细胞内的形态发生、病毒侵染后细胞器的超微病理变化作了观察和分析。现将研究结果报告如下：

材料与方法

1 病毒多角体的来源和提取

山楂粉蝶核型多角体病毒，由内蒙古园艺科学研究所提供。将人工感染典型发病致死的虫体研磨成匀浆，纱布过滤去残渣、数次差速离心后，收集提取的病毒多角体，然后再经40～60%（W/W）蔗糖密度梯度离心，3000 r/min 2 h，收集多角体去除蔗糖，将获得纯净的多角体保存在4℃冰箱内备用。

2 多角体病毒对幼虫的感染

取上述提纯的核型病毒多角体，配制成浓度为5×10^8 PIB/ml的悬液，将该悬液涂抹在干净的幼嫩海棠叶片上，凉干后，对经饥饿数小时的三龄山楂粉蝶幼虫进行添食，食完后饲喂新鲜叶片，并设正常的对照组。

本文于1996年1月17日收到，3月20日修回

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 电镜样品的制备

分别取感染Acr NPV后24、48、72、96、120、144、168 h幼虫的中肠，脂肪体等组织细胞，迅速切成1 mm^3的小块，并立即投入2.5%戊二醛溶液中作预固定，数小时后用pH 7.2　0.1 mol/L PBS净洗组织块，然后，再用1%四氧化锇固定1h，经系列梯度酒精脱水，饱和乙酸铀块染，浸透后，用苯甲酸二丙烯酯包埋，在60～65℃下聚合72 h，用LKB－2128型超薄切片机切片，切片经柠檬酸铅溶液染色后，在JEM-100C型透射电子显微镜下观察，加速电压60KV，摄相分析。

结　果

1 病症表现

山楂粉蝶幼虫经其多角体病毒感染后，在72 h以前，虫体表面无明显病症出现，72 h后，幼虫食欲减退，爬行迟钝，生长发育减慢，体节肿胀，体色由褐色变成深粉红色，表皮稍触即破，流出腥味脓液，多数幼虫尾足悬挂而死亡。对照组幼虫生长正常。

2 多角体病毒在体内的形态发生

山楂粉蝶幼虫感染96 h后，在中肠上皮细胞内可以观察到细胞核膨大，核质中开始出现密度较小的病毒发生基质。120～144 h后病毒发生基质增多，核衣壳、套膜大量出现，有时还看到丝状纤维与块状多角体蛋白的形成(图1)，它为核衣壳获得套膜装配成病毒粒子和病毒束的嵌入提供了物质基础。从图2中显示的两大块丝状纤维不难看出它与前多角体结构蛋白的关系非常密切。从丝状纤维到致密的前多角体结构蛋白应该说有一个发生和发展的过程(图3)。然而有时在细胞质内看到几个致密或着色较浅的多角体蛋白，其中有的已进入单个的病毒粒子。在胞核内大量的病毒粒子和病毒束同时分别进入大小不等的块状多角体蛋白(图4)，装配成完全的病毒多角体的最后一个程序，即获得封闭的多角体膜，自成一体(图5)。图6是一个高倍放大的病毒多角体的切片，多角体蛋白晶格呈线型平行排列，从该多角体内可看出病毒束横切面内的病毒粒子有1、2、3、4、5、6、7……不等的数目，病毒束由两层套膜所包封。

3 病毒侵染后宿主细胞器的超微病理变化

正常的山楂粉蝶幼虫，中肠上皮细胞内的细胞器均未发现有明显的病变，脂肪体细胞内亦未见到病毒粒子、多角体以及细胞器的病理变化。然而山楂粉蝶幼虫被AcrNPV侵染后，该宿主中肠上皮细胞的主要细胞器均发生了显著的病变，如内质网在感染后期大量出现呈指纹型内质网(图7)，有许多内质网扩张为内质网池，在其附近分散的许多线粒体，其嵴也模糊不清(图8)。粗面内质网扩张为较大的内质网池外，其上的核糖体颗粒大量脱落，在其间有一个拉得狭长形状的线粒体(图9)，后期线粒体的嵴消失变成空泡化(图10)，多泡体的出现也非常显著如*标记。在图11、12、13中显示三种不同形态结构的髓膜样结构。此外，还有病毒侵染发生早期引起宿主一般的细胞变化，如细胞核有些肿胀，核糖体增生等变化在此均不另作介绍。

讨　论

1　昆虫核型多角体病毒的形态发生，一般可分为病毒发生基质的形成，核衣壳和套膜的出现，核衣壳获得套膜，并装配成完全的病毒粒子和病毒束，丝状纤维与块状多角体蛋白的堆积，病

维普资讯 http://www.cqvip.com

毒粒子或病毒束的嵌入，最终多角体膜封闭后装配为成熟的或称为完全的病毒多角体等四个阶段[5,6]。本实验也证实了这一个病毒形态发生过程的基本程序。

2 宿主被病毒侵染后，在一定的时间内，中肠上皮细胞核内及核外均有许多丝状纤维出现，张立人(1980,1990)等曾在斜纹夜蛾、灰茶尺蛾等幼虫核型多角体病毒的形态发生过程中发现丝状纤维与其基本相同，并认为这些丝状纤维可能就是多角体蛋白的前身。我们认为如能通过免疫电镜技术来证明该物质与多角体蛋白的血清学关系是否存在，以及它在细胞内产生的部位如何？均有待进一步研究。

3 山楂粉蝶幼虫感染病毒后，在其中肠组织的细胞质内发现有多角体蛋白存在，有的还含有少量病毒粒子和病毒束，这些多角体蛋白较核内多角体蛋白染色较浅。根据文献报道[7-8]许多学者在研究家蚕质型多角体病毒的发生和细胞病理时，在其宿主细胞核内与核外均含有多角体蛋白，Hajime M[11]等还证实家蚕质型多角体病毒中有一突变株的包涵体在核内出现，并阐明了它们的氨基酸序列、基因组基因片段、分子量与正常的家蚕质型多角体病毒均不相同。然而在核型多角体病毒的形态发生过程中，在质内发现多角体尚无报道。我们认为这种现象有两种可能性：其一，病毒感染后期核膜破裂，多角体蛋白进入细胞质，也就是说其本质上与核内多角体是一样的。但是我们观察到的核外多角体蛋白比核内多角体嗜锇性较差，染色较浅，且大多数不含病毒粒子，似乎不同于核内多角体蛋白。其二，这些多角体蛋白是在细胞质内产生，它有可能存在着NPV发生的一种新的途径或机制。

4 细胞核是细胞的最重要的组成部分，可以称为细胞的"中央系统"，它对细胞的代谢生长，分化与繁殖发出"指令"，从而调控整个细胞的各项活动，细胞的遗传物质主要储存于此。当病毒基因组侵入细胞后，首先占据细胞核，并开始打乱了宿主细胞的一切正常生命活动，同时逐步而且很快地成为"主导者"，为此细胞的各种细胞器均作出反应，细胞器的生理功能受到影响或较大的破坏，其中特别是线粒体和粗面内质网首当其冲，因其能量代谢和蛋白合成均受到制约，乃致功能完全丧失。例如为了病毒本身的复制和装配的需要，以满足病毒复制所需的大量能量，粗面内质网在病毒感染初期大量增生，也反应了细胞内蛋白质合成活动加剧。

总之，病毒的侵染和增殖与宿主细胞器的结构和功能的崩溃和丧失是相互矛盾、相互统一、相互制约的必然结果。

参 考 文 献

1 Bergold GH. Insect pathology, An Advanced Treatise, Vol. 1, Steinhaus E A ed, Academic press, 1963;9:413

2 李淑琴，赵怀玉，张立人，等. 山楂粉蝶核型多角体病毒的分离与电镜观察. 自然杂志，1984;8(8):605

3 李岩涛. 山楂粉蝶核型多角体病毒的研究，内蒙古大学学报，1987:18(1):155～162

4 关书奎，张建红，张立人，等. 山楂粉蝶核型多角体病毒的超微结构和某些生化特性，病毒学报，1991:7(4):362～368

5 Summers M D. Ultrastructual studies on Inclusion Formation and Qirus occubsion in Nuclear Polyhedronsis and Granulosis Virus - infected cell of *Trichoplusia ni* (Hubnea). J Ultrastruct Res 1969;28:462～480

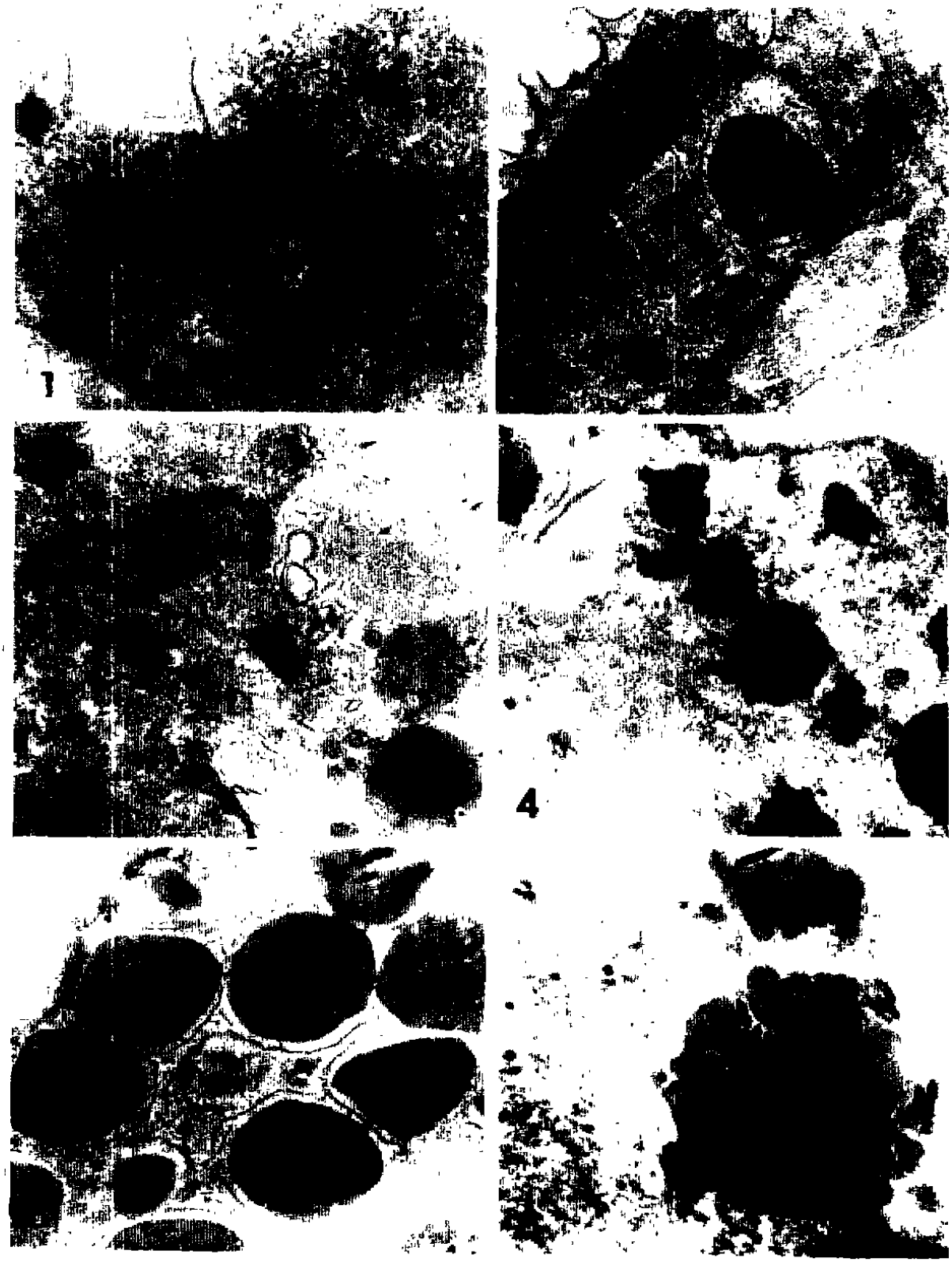
6 张立人主编. 中国昆虫病毒电子显微镜图谱，北京科学出版社，1988

7 张建红，高玮，张立人. 家蚕质型多角体在蚕体内的形态发生及其细胞病理变化，蚕业科学 1990;16(3):140～144

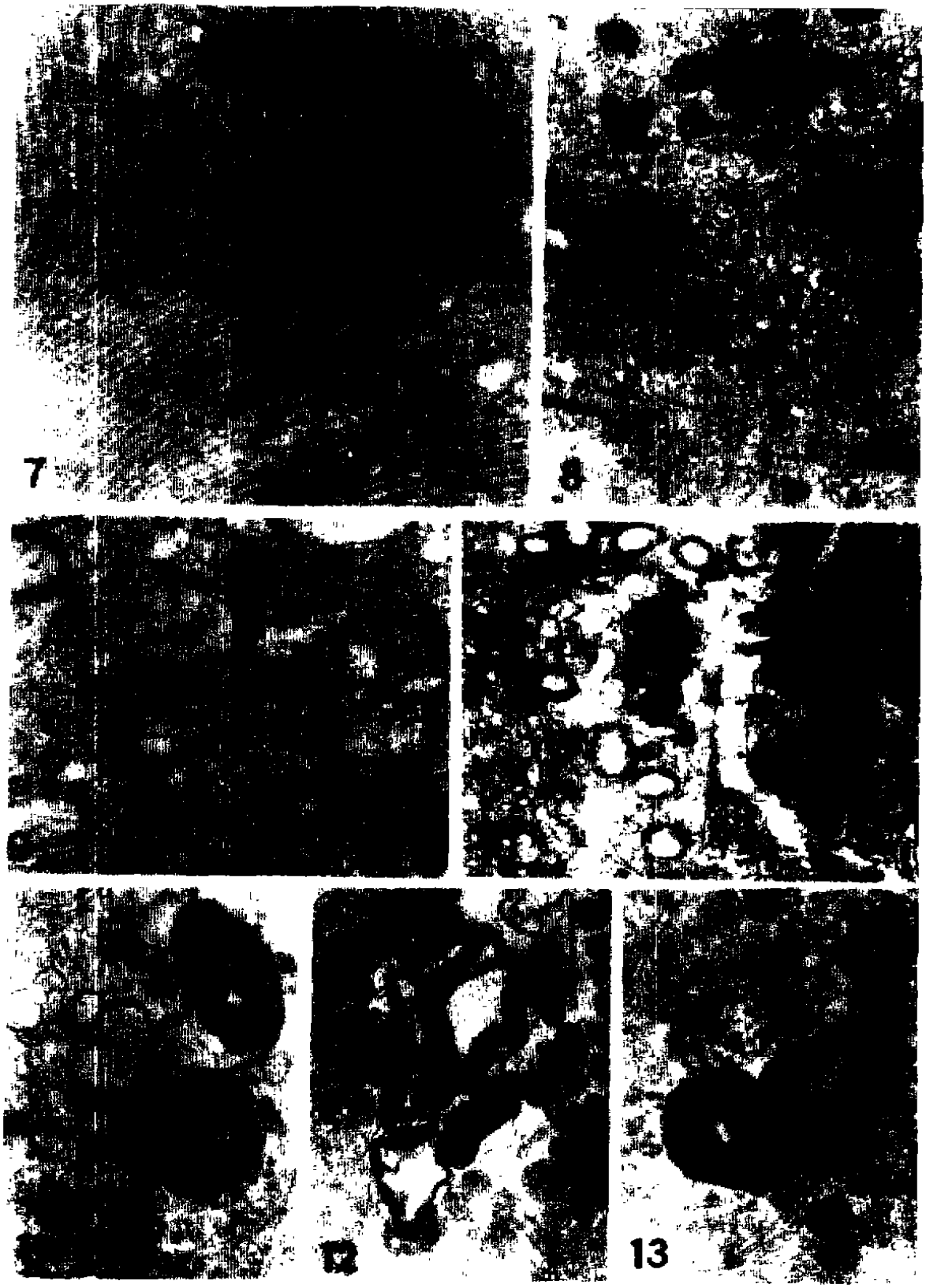
8 Hajime M, Takuji S, Yuzo M. Differcuel of proteins from inclusion bodies formed in the nucleus and cytoplesm of the cytoplasmic polyhedrosis virus-infeted midgut in the silkworm, *Bombyx mori*. J of Inven Patho, 1987;50:26

9 Zhang Liren, Chen Dihua, Zhang Jianhong. Ultrastructure study of morphogenesis of NPV of *Ectropis grisescens*. Proceedings of the XIIth International congress for EM, USA, 1990:648～649

维普资讯 http://www.cqvip.com



维普资讯 http://www.cqvip.com



维普资讯 http://www.cqvip.com

图1　山楂粉蝶NPV侵入120小时后,在山楂粉蝶幼虫中肠上皮细胞核内出现病毒发生基质、核衣壳,套膜,丝状纤维,块状多角体蛋白。×20000

图2　丝状纤维与大量病毒发生基质在开始装配核衣壳。×20000

图3　在细胞质内出现几个大小不等、着色较浅的多角体蛋白,有少数病毒粒子侵入其中。×20000

图4　病毒束进入块状多角体蛋白。×20000

图5　病毒多角体获得多角体膜。×20000

图6　病毒多角体高倍放大像,蛋白晶格清晰可见。×54000

图7　指纹型排列的粗面内质网结构。×20000

图8　大量的光面内质网。线粒体内基质密度较高。×20000

图9　粗面内质网上的核糖体大量脱落,线粒体拉长或破裂。×20000

图10　大量线粒体的嵴消失,基质变空。×20000

图11　两个同心圆似的髓鞘样小体。×20000

图12、图13均为无定型的髓鞘样小体。×20000与×26000

Fig 1　Profuse virogenic stroma, nucleocapsid, envelope, filament and polyhedrin within midgut cell nuclei after infected 120 hous by Acr NPV. ×20000

Fig 2　Nucleocapsids assemblied with filament and virogenic stroma. ×20000

Fig 3　Some polyhedrin with virions in cell plasma. ×20000

Fig 4　Viral bundle going into polyhedrin. ×20000

Fig 5　Acr NPV is obtaining polyhedral 'ody membrane. ×20000

Fig 6　Protein crystal lattice in Acr NPV. ×54000

Fig 7　Finger print typed RER. ×20000

Fig 8　Great number of smoothendoplasmic reticulum. ×200000

Fig 9　Ribosome drop from RER and mitochondrial cleaved. ×20000

Fig 10　Mitochondrial cista disappear and its matrix vacuolation. ×20000

Fig 11　Two concentric myloid bodies. ×20000

Fig 12－13　Amorphous myloid bodies, ×20000 and ×26000

Morphogenesis and Cytopathic Changes of *Aporid crataegi* Nuclear Polyhedrosis Virus

Chai Yixin　Zhang Liren

(*Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan* 430071)

Li Shuqing　Zhang Lijun

(*Nimong Institute of Horticulture, Huhehaote* 010010)

The morphogenetic process of Acr NPV *in vivo* and cytopathology of its host cells were observed and analysed using electron microscopy techniques after Acr NPV infected larval stage host. The investigation shows: after innoculation 72～168 h, profuse virogennic stroma, nucleocapsid, envelope, filament, polyhedrin, virion, viral bundle and complete Acr NPV existed within midgut epithelia cells. The cell organs have apparent pathological changes. Endoplasmic reticuium takes the form of fingerprint type, and there are a lot of myloid bodies.

Key words　*Aporid crataegi* NPV, Morphogensis, Cell organ, Ultrastructure, Pathological change