维普资讯 http://www.cqvip.com

第16卷2期 中国病毒学 16(2): 151－154
2001年6月 VIROLOGICA SINICA Jun. 2001

棉铃虫核多角体病毒在中肠及其它组织中增殖过程的电镜观察

张严峻[1], 谭军[2], 林玉清[2]

(1.浙江省疾病预防控制中心,浙江杭州 310009; 2 浙江大学,浙江杭州 310029)

The Reproduction of Nuclear Polyhedrosis Virus in the Midgut Epithelial Cell and the Other Sensitive Cell of *Helicoverpa armigera*

ZHANG Yan-jun[1], TAN Jun[2], LIN Yu-qin[2]

(1. *Zhejiang Center for Disease Control and Prevention*, *Hangzhou* 310009, *China*;
2. *Zhejiang University*, *Hangzhou* 310029, *China*)

Abstract: The reproduction of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus in the midgut epithelia cells and the other sensitive tissues was observed by electron microscopy. The reproducing viruses in the midgut epithelia cells were mostly without envelopes, and thte polyhedrons were seldom formed. The reproduciing viruses in the other sensitive cells were with envelopes, and packed in polyhedrons.

Key words: Nuclear polyhedrosis virus; *Helicoverpa armigera*; Reproduction methods

摘要: 应用电子显微镜技术观察了核多角体病毒在棉铃虫体内的增殖方式。在中肠细胞内增殖的核衣壳极少被囊膜包围,也很少形成多角体。它们能大量地释放到体腔,迅速感染其他敏感组织。在其他敏感组织内增殖的核衣壳大部分被囊膜包围形成病毒粒子,且随机包涵在多角体中形成核多角体。

关键词: 核多角体病毒; 棉铃虫; 增殖方式

中图分类号: S435.6223 **文献识别码**: A **文章编号**: 1003-5125(2001)02-0151-04

核多角体病毒是以鳞翅目昆虫为主要宿主的病毒。有关病毒在昆虫中肠细胞内增殖的研究报道较少。Cunningham 报道了核多角体病毒在 *Lambdina fiscellaria* 的中肠细胞内繁殖,但不形成多角体[1]。鳞翅目昆虫的中肠细胞与其它组织比较,核多角体病毒的感染性低,很难形成多角体。Granados 报道了家蚕核多角体病毒在中肠细胞内繁殖,产生的核衣壳不被囊膜包围,而是通过核膜孔进入细胞质内,然后进入血腔,再感染其他组织[2]。为了揭示核多角体病毒的增殖方式,我们用棉铃虫核多角体病毒做了进一步的研究。

1 材料与方法

1.1 昆虫

挑选生长整齐的健康棉铃虫五龄幼虫用于试验。

1.2 病毒

核多角体病毒由中科院病毒所提供。

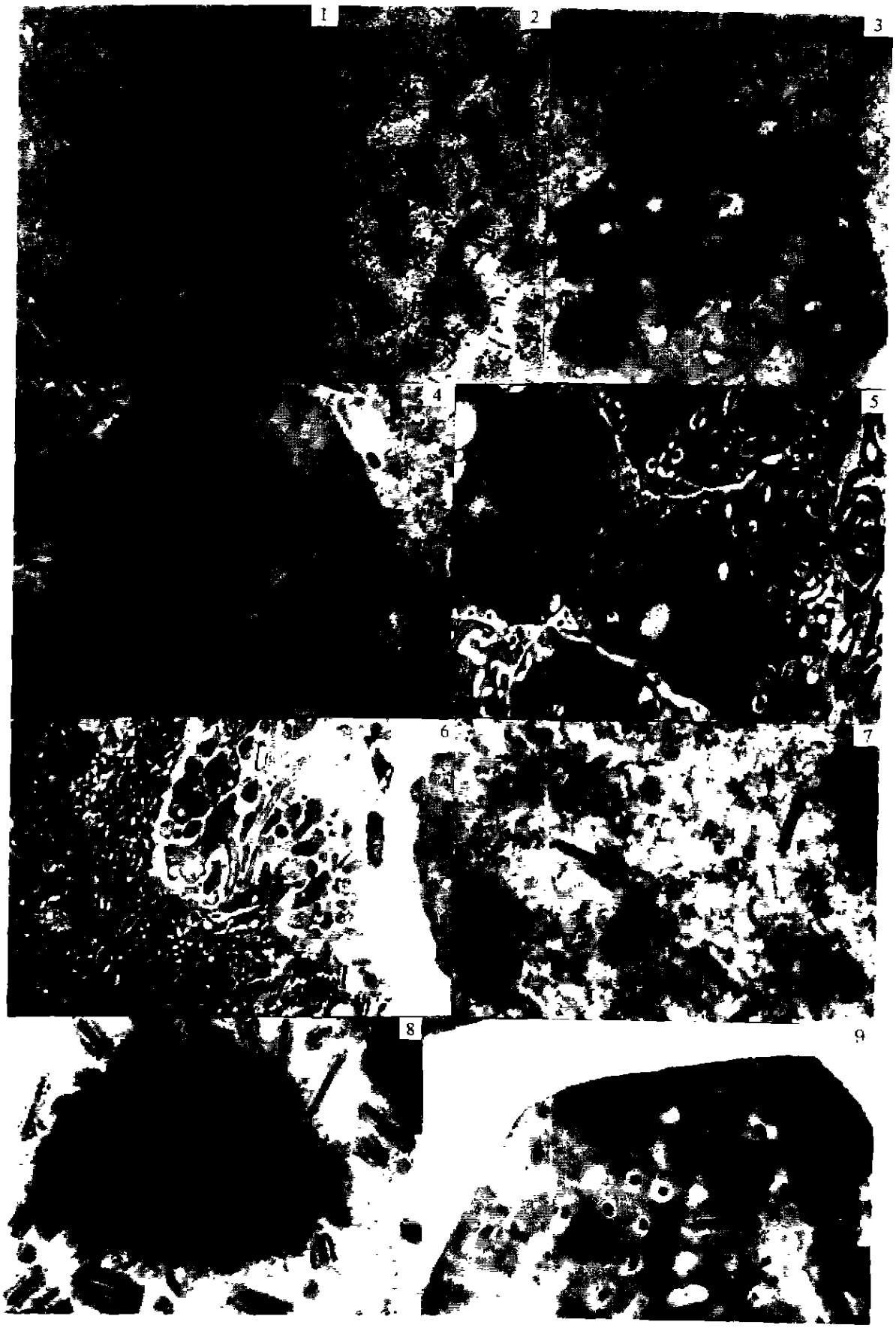
1.3 多角体及其病毒粒子的纯化

组织捣碎机捣碎感染核多角体病毒致死的棉铃虫幼虫,四层纱布过滤,滤液 3500 r/min 4℃下离心 20 min,收集白色沉淀,加入蒸馏水制成悬液,3 500 r/min 4℃下离心 20 min,如此重复次数,提纯多角体病毒。在提纯的多角体悬液(1×10^8 PIB/mL)里加入等体积的 0.05 mol/L Na_2CO_3 和 0.0125 mol/L NaCl 混合液,28℃～30℃水浴 15 min,使多角体完全溶解。溶解液 3 500 r/min 4℃离心 20 min,取上清 12 000 r/min 4℃离心 30 min,取沉淀,用少量 0.1 mol/L pH7.2 磷酸缓冲液悬浮,制成纯化的病毒粒子。

收稿日期:2000－01－24,修回日期:2000－11－20

作者简介:张严峻(1968－),男,浙江东阳籍,助理研究员,硕士,主要研究方向为病毒学。

维普资讯 http://www.cqvip.com



维普资讯 http://www.cqvip.com

图1　核多角体病毒的增殖和释放

1.接种后12 h,中肠示圆筒形细胞病毒感染初期,染色质凝结成块(×8000)；2.接种后24 h,无囊膜的核衣壳在网状的生成基质(VS)中形成(×50000)；3.接种后24 h,在中肠细胞中不包埋没有囊膜的核衣壳的前多角体(×30000)；4.接种后24 h,在中肠细胞中不包埋核衣壳的成型多角体(×50000)；5.接种后24 h,病毒粒子细胞质出芽至细胞间隙(×15000)；6.接种后24 h,病毒粒子细胞质出芽,通过基底膜至体腔(×15000)；7.接种后36 h,在脂肪体中核衣壳被囊膜包住(×60000)；8.接种后48 h,出现正在包埋病毒粒子的多角体(×60000)；9.接种后72 h,出现成熟的核多角体(×60000)。

Fig 1　The reproduction and release of nuclear polyhedrosis virus

1. The chromatin agglutinating in the midgut epithelial cell at 12th-hour after postinoculation (8000×)；2. The viruses forming in the VS(virogenic stroma) at 24th-hour after postinoculation (50000×)；3. The embryo polyhedron not pocking nucleocapsids without envelopes in the midgut cells at 24th-hour after postinoculation (50000×)；4. The complete polyhedron not pocking the viruses without envelopes in the midgut cells at 24th-hour after postinoculation (50000×)；5. The viruses sprouting among the cells at 24th-hour afterpostinoculation (15000×)；6. The viruses sprouting from membrane of cytoplasm entering into body cavity through base membrane at 24th-hour after postinoculation (15000×)；7. The nucleocapsids with envelopes in fat body at 36th-hour after postinoculation (60000×)；8. The embryo polyheddron wrapping viruses at 48th-hour after postinoculation (60000×)；9. The complete nuclear polyhedrosis virus being found at 72th-hour after postinoculation (60000×).

1.4　核多角体病毒增殖的电镜观察

用圆头注射器将约5×10^7个多角体量的纯化核多角体病毒粒子经口注入五龄幼虫中肠内。病毒接种后2 h、4 h、6 h、12 h、24 h、36 h、48 h、72 h取出中肠组织和脂肪体,按常规方法固定,脱水,渗透,包埋,超薄切片,切片经醋酸铀和柠檬酸铅染色后,置于日立H-600透射电子显微镜下观察摄像。

2　结果

2.1　病毒在中肠细胞内的增殖

图1－1示中肠圆筒形细胞,接种后12 h,细胞核核仁变大,数目增多,接着染色质凝集成块并在核中央集中。表明细胞处于病毒感染的初期。接种后24 h,许多核衣壳在的病毒发生基质中形成。中肠细胞内生成的病毒粒子是无囊膜的核衣壳(图1－2)。中肠细胞内也极少形成多角体,即使形成多角体,也不包埋核衣壳。图1－4示中肠细胞中形成的前多角体,它不包埋核衣壳。图1－5示中肠细胞中包埋核衣壳的成型多角体。接种后24 h,可观察到核衣壳移出细胞核,进入细胞质。它们通过细胞质膜出芽释放。释放的病毒粒子获得了囊膜。它们有的进入细胞间隙(图1－5),通过细胞间隙进入幼虫体腔,有的通过基底膜直接进入幼虫体腔(图1－6),成为其它敏感组织的感染原。

2.2　核多角体病毒在其它敏感细胞内的增殖

接种后36 h,可观察到病毒粒子在其它敏感细胞内增殖,生成的大部分核衣壳先被囊膜包住,形成有囊膜的病毒粒子(图1－7)。接种后48 h,可观察到病毒粒子随机被多角体包埋,这种包埋接近完成时形成前多角体(图1－8)。接种后72 h,可观察到有一定形状的核多角体病毒(图1－9)。

3　讨论

棉铃虫NPV侵入棉铃虫的最初部位是中肠。曾有报道棉铃虫NPV不在中肠上皮细胞内增殖[3]。本试验观察发现,棉铃虫NPV先在中肠上皮细胞内增殖。受感染的中肠上皮细胞染色质凝集成块并在核中央集结,形成网状的病毒发生基质。病毒粒子在病毒发生基质中生成。病毒发生基质结构的大小和密度可以反映核衣壳形成的数量潜力[4]。病毒粒子在中肠细胞内增殖时不形成囊膜。也极少形成多角体,即使形成多角体,也不包埋核衣壳。有报道幼虫受到棉铃虫NPV严重感染时,中肠细胞内形成多角体[5]。有关NPV是否先在中肠细胞内增殖有不同的看法,如Granados和Lawler报道了*Autographa californica*核多角体病毒感染幼虫后,病毒粒子不是在中肠细胞内繁殖,而是通过细胞质直接游离到体腔内,感染循环血细胞,再感染其他组织[6]。而Barrett等人发现*Autographa californica*核多角体病毒先感染幼虫的中肠上皮细胞、血细胞和与中肠相连的微气管,病毒通过感染微气管再感染其它组织[7]。现在多数看法是NPV先在中肠细胞内增殖,但极少形成多角体[8~11]。

在中肠细胞内增殖的核衣壳通过细胞质膜出芽释放。这些释放的病毒粒子或进入细胞间隙或通过基底膜移入体腔。微气管中有易感的微气管胚细胞,病毒粒子通过感染微气管再感染其它组织[7]。病毒能穿过基底膜是因为与中肠上皮细胞相连的微气管胚细胞穿越了基底膜[12]。

在中肠细胞内增殖的病毒粒子是无囊膜的核衣

维普资讯 http://www.cqvip.com

壳，它们不被多角体包埋。它们在释放时通过细胞质膜出芽获得囊膜。而在其它敏感细胞内增殖的病毒粒子有囊膜。它们的囊膜或经细胞质膜出芽获得，或由粗糙内质网衍生而来[9~10]。有囊膜的病毒粒子被随机包埋形成前多角体，前多角体不断增大，最后形成成熟的多角体。棉铃虫核多角体呈近圆形或不规则形[3,5]。

参考文献

[1] Cunningham jc. AN Ultrastructural study of the development of a nuclear polyhedrosis virus of the eastern hemlock looper, Lambdina fiscellaria[J]. Canaddian J Microbio, 1971, 17:69－72.

[2] Granados RR. Infectivity and mode of baculoviruses[J]. Biotechnol Bioengin, 1980, 22:1377－1405.

[3] 华中师院生物系昆虫病毒研究室 棉铃虫核多角体病毒病的组织病理研究[J]. 昆虫学报, 1978, 21(2):133－136.

[4] Harrap KA. The structure of nuclear polyhedrosis viruses. III. Virus assembly[J]. Virology 1972, 50:133－139.

[5] 乐云仙. 棉铃虫核型多角体病毒病的研究(Ⅰ)症征和病原物[J]. 复旦学报(自然科学版), 1978, 78(1):79－85.

[6] Granados RR, Lawler KA. *In vivo* pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection [J]. Virology, 1981, 108:297－308.

[7] Barrett JW, Brownwright AT, Primavera MJ, *et al* Studies of the nucleopolyhedrovirus infection process in insects by using the green fluorescence protein as a reporter[J]. J Virol, 1998, 72:3377－3382

[8] Tanada Y, Hess RT, Omi EM. Invasion of a nuclear polyhedrosis virus in midgut of the armyworm *Pseudaletia unipuncta*, and the enhancement of a synergistic enzyme [J]. J Invert. Pathol, 1975, 26:99－104.

[9] Tanada Y, Hess RT. Development of a nuclear polyhedrosis virus in midgut cells and penetration of the virus into the hemocoel of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta* [J]. J Invert Pathol, 1976, 28:67－76.

[10] Adams TR, Goodwin RH. Electron microscopi Investigationd on invasionn and replication of insect baculoviruses, *in vivo* and *in vitro* [J]. Biol. Cellulaire, 1977, 28:261－268.

[11] Kelly DC. Baculovirus rephcation[J] J Gen Virol, 1982, 63:1－13.

[12] Engelhard EK, Kam-Morgan LNM, Washburn JO, *et al* The insect tracheal system: a conduin for the systemic spread of *Autographa Californica* M nuclear polyhedrosis virus [J]. PNAS. USA, 1994, 91:3224－3227.