

油桐尺蠖核型多角体
病毒的研究及制剂的生产与应用

鉴定会资料



湖南省微生物研究所

一九八四年十二月

5.6
2

前 言

湖南省是我国农林牧副渔业享有盛名的基地，茶叶为本省主要出口产品之一，油桐产量亦居全国第二位。在保证茶叶优质无残毒，油桐稳产高产的一系列农业技术措施中，植保工作也是其中的重要组成部分。因此迫切要求探索防治害虫的新途径。

我们于1977年9月在湖南网岭茶园发现罹病死亡的油桐尺蠖，从中分离获得了油桐尺蠖核型多角病毒体(简称BSNPV)。经室内、外感染试验证明该病毒对宿主昆虫有较强的致病力，并于1980年通过了田间防治效果的鉴定。在此基础上，我们对病毒的形态结构、理化性质、制剂生产等，作了进一步的研究。从制剂的配方上提高了病毒的应用效果。参照国内外有关资料，以小白鼠、家兔、家蚕、蜂、鱼、猪、鸡胚细胞、猪肾细胞，以及恒河猴等为对象，进行了大量的安全性试验。结果表明，BSNPV不感染上述实验动物，不引起细胞病理变化。“猴的试验”除做了体徵及心、肝、肾等多种常规检查之外，并对其全部内脏器官及脑组织进行了病理切片观察，部分器官还作了超薄片的检查。目前国内尚未见有这方面的报道。通过对制剂的反复研制和施用技术的不断探讨，病毒使用量已由1980年的1,500亿以上/亩下降到100亿/亩以下，应用范围从茶园扩大到了油桐林，截至1984年为止，应用亩数已达230,762.2亩次。值得提出的是，历年来所进行的后效作用调查，结果都证明后效明显，一般虫口下降率为90%左右，甚至于出现“无虫”区。在检查防效时，曾多次发现未施用地区也有不少罹病死虫，为此，我们设计了扩散试验，经三年的试验结果证明油桐尺蠖核型多角体病毒确有较强的扩散作用。在我国进行扩散试验属于一项新的探索。研究病毒治虫时，人们往往将注意力集中在如何增殖病毒，加大生产量来满足大面积防治的需要。而后效作用和扩散作用所显示的结果，启示我们从另一角度来寻求解决病毒需要量的途径。根据以上试验结果，我们认为：在油桐林施用BSNPV，有可能获得“一劳久逸”的防治效果。这将是一项十分有经济效益和社会效益的成功。

关于利用昆虫病毒防治害虫的研究，国外在四十年代即已开始，而今美国、日本、澳大利亚都有正式注册的病毒商品。苏联等其它国家也有生产和应用。我国对昆虫病毒的研究起始于五十年代，七十年代综合防治的植保方针得到重视后，利用昆虫病毒的研究进入了发展阶段，先后发现100多种昆虫病毒，有的已在实际应用之中。

油桐尺蠖核型多角体病毒，目前国外尚未见有报导，我们的研究结果发表后，美国North Carolina State University Clemson University Florida University和以色列Weizmann Institute of Science等单位均来函索取资料。本集中的“大尺蠖核型多角体病毒的研究”一文摘要已收入Review of Applied Entomology中(1982年70:8)。

本研究是在省科委、省农业厅直接领导下完成的，并得到了省林业厅的大力支持，以及十多个兄弟单位的热情协助，谨在此，致以诚挚的谢意。

编者 1984年12月

目 录

前 言

一、大尺蠖核型多角体病毒的研究.....	(1)
二、油桐尺蠖核型多角体病毒的提取.....	(8)
三、油桐尺蠖核型多角体病毒的形态及结构的电镜观察.....	(11)
四、油桐尺蠖核型多角体病毒的核酸、多角体蛋白及某些特性的研究.....	(14)
五、油桐尺蠖核型多角体病毒室内增殖试验.....	(21)
六、油桐尺蠖核型多角体病毒标准品毒力的生物测定.....	(25)
七、油桐尺蠖核型多角体病毒制剂的研究及实验室生产.....	(28)
八、油桐尺蠖核型多角体病毒制剂的筛选.....	(33)
九、油桐尺蠖核型多角体病毒对油桐尺蠖的防治效果及后效作用.....	(38)
十、油桐尺蠖核型多角体病毒制剂的扩散试验.....	(52)
十一、油桐尺蠖核型多角体病毒对恒河猴亚急性毒性试验.....	(61)
十二、油桐尺蠖核型多角体病毒感染恒河猴部份内脏的超微结构的观察.....	(69)
十三、油桐尺蠖核型多角体病毒对小白鼠的安全性试验.....	(72)
十四、油桐尺蠖核型多角体病毒对家兔的安全性试验.....	(77)
十五、油桐尺蠖核型多角体病毒对仔猪的安全性试验.....	(83)
十六、油桐尺蠖核型多角体病毒对鱼的安全性试验.....	(92)
十七、油桐尺蠖核型多角体病毒对蜜蜂的安全性试验.....	(94)
十八、油桐尺蠖核型多角体病毒对家蚕的安全性试验.....	(96)
十九、油桐尺蠖核型多角体病毒感染两种脊椎动物细胞的试验.....	(98)

大尺蠖核型多角体病毒的研究

甘运凯

(湖南省微生物研究所)

摘要 1977年从湖南省网岭茶园内罹病大尺蠖幼虫中分离获得大尺蠖核型多角体病毒。多角体近圆形、菱形、三角形或六方形,大小约1.2—3.6微米。电镜下观察病毒粒子为杆状(49—63毫微米×251—282毫微米)。属杆状病毒科(Baculoviridae)杆状病毒属(Baculovirus) A亚组(Subgroup A)。

对4—5龄大尺蠖室内口服的致死中浓度(LC_{50}):4天为 $10^{-4.407}$ (787个多角体),9天为 $10^{-5.00}$ (243个多角体),11天为 $10^{-8.521}$ (7个多角体)。不同感染方法感染3—4龄幼虫,其致病力不同。大田防治杀虫效果达98%,并有后效作用。

※ ※ ※ ※

大尺蠖(*Buzura suppressaria* Gueneé)又名油桐尺蠖,为分布较广的杂食性害虫,为害茶叶、油桐、漆树、乌桕、桃、李及柑桔等。在湖南茶园内一年发生二代,有时暴发成灾。1977年9月在湖南网岭茶园发现自然罹病死亡的大尺蠖,从中分离出核型多角体病毒。

国内有人进行了大尺蠖核型多角体病毒粒子的初步观察(朱国凯,1979),但其它方面尚少报道。3年来我们进行了病毒学及室内、外感染试验。本文报告研究结果。

材料与方 法

一、材 料

大尺蠖核型多角体病毒系从罹病死虫体内分离获得。感染试验用初步提纯的多角体,大田试验用幼虫尸体的匀浆液。

试验幼虫采自茶园,室内饲养观察后用于试验。

二、方 法

1.多角体的分离 感病死亡的大尺蠖置组织研磨器中研磨过滤,500转/分离心,取

本文原载《昆虫学报》1981第24卷第4期

本所鲁迎新同志参加了部分工作。武汉大学病毒系电镜室胡远扬同志协助拍照,特此致谢。

上清液再经3,000—4,000转/分离心30分钟,洗涤数次,即可获得较纯的多角体。用血球计数法测数。置冰箱保存备用。

2.多角体的检查 将提纯的多角体、病虫的血淋巴及组织块,进行涂片或压片,用什维佐娃法染色及镜检(陈常铭,1955)。

3.病毒粒子的分离 提纯的多角体用无菌水洗两次,取1克湿品加4毫升0.01M碳酸钠和1毫升0.05M氯化钠溶液,置25—30℃温箱2—5小时,离心(3000转/分)取上清液,再经8000转/分冷冻离心30分钟,去沉淀,留上清液,置-18℃低温冰箱保存。

4.化学药剂对多角体的溶解试验 将巴丹、乙醚等15种化学药剂用无菌水稀释一定倍数,分别取1毫升。加入1毫升多角体悬液,充分混匀,置0—4℃冰箱,1.5小时及68小时后,镜检多角体是否溶解,并测PH值。

5.室内感染试验。

(1)致死中浓度(LC_{50})的测定 用提纯的大尺蠖NPV* (含243.373亿PIB/毫升)感染4—5龄幼虫,按不同稀释倍数分8组单虫饲养。喂前停食半天,用微量注射器滴喂病毒液1微升,喂后对吐胃液的虫弃之不用。死虫均作涂片染色镜检。按Reed氏和Muench氏(1938)50%致死量的计算方法求 LC_{50} 。

(2)不同龄期对NPV的敏感性测定 用大尺蠖NPV感染3龄、4龄、5—6龄幼虫,每组10—20头,每头滴喂0.5微升(3.6万及1.8万PIB),观察12天,死虫及活虫均作镜检,组织及血淋巴内有多角体者为阳性。

(3)不同感染方法对致病力的影响 把制备好的病毒粒子及多角体,稀释为 10^{-2} — 10^{-6} 浓度,感染2—5龄幼虫,给药方法为腹足前侧微量注射或滴喂,观察两种感染途径的致病情况。

(4)化学药剂与多角体混用试验 每组用3—5龄幼虫15头,每头滴喂混合液1微升,每微升混合液除含多角体722万个外,尚分别有下列药品:硫酸铜60微克,过磷酸钙50微克,敌敌畏(50%)10微克,硫酸亚铁60微克,尿素50微克,明矾60微克。水为对照。

6.大田防治试验

试验在湖南省网岭茶园进行,试验面积为16亩(普杀)及200亩(点杀),邻近的茶区为对照区。普杀使用超低量喷雾,病毒浓度为12亿PIB/毫升,喷时加1%活性炭。点杀使用背包式喷雾器,病毒浓度为0.13亿PIB/毫升加1%墨汁。定点观察结果。

1979年5—6月进行了室内及4亩茶园的病毒杀虫试验,并与化学农药进行比效,使用浓度见表1**。

* NPV为核型多角体病毒,PIB为多角体。

** 本所李秋云、鲁迎新、张松柳、贺衡萍及朱邦雄等同志参加了部分工作。

表1 NPV及化学药剂杀虫试验的使用浓度

药剂品名	室内使用浓度	茶园使用浓度	备 注
NPV	10亿PIB/ml	3000亿PIB/亩	1) 0.5亩茶园面积兑水量为1,700毫升;
NPV	10亿PIB/ml	3000亿PIB/亩	2) NPV处理组加1%活性炭;
硫酸铜	稀释2000倍	2.2克/亩	3) 使用超低量喷雾器, 分两次施药。
敌敌畏	稀释1000倍	240克/亩	
水(对照)			

结果和讨论

一、多角体的形态: 大小及数量

在光学显微镜下, 大尺蠖多角体的大小形态不一, 折光性强, 呈近圆形、三角形、菱形、方形及六方形等(图版I—1)。

用1%的氢氧化钠水溶液处理多角体, 1分钟后可见多角体不断消失。

随机测定79个多角体, 其大小为1.2—3.6 μ 。

对17头4—5龄自然罹病死虫体内的多角体进行测数, 每头死虫平均产生227.25亿个多角体, 每克干虫平均含多角体332.36亿个。

二、病毒粒子的形态

病毒粒子为杆状, 平均大小为49~63毫微米 $\times$ 251~282毫微米, 两端钝圆, 一端有一小突起, 长约10毫微米(图版I—2)

多角体内还有许多球状体及V形体。

三、化学药剂溶解多角体的结果

15种化学药剂(巴丹、西维因、杀虫醚、马拉硫磷、滴滴涕、敌敌畏、乐果、新洁尔灭、来苏尔、乙醇、甲醛、乙醚、氯仿、二甲苯、氢氧化钠仅有氢氧化钠能溶解多角体, 对其生理活性的影响尚待进一步观察。

四、感染试验

1. 感染后的症状及病理

大尺蠖幼虫罹病后食欲减退并呕吐, 行动迟钝, 发育减慢。5—10天内为死亡高峰, 以尾足倒挂于枝叶或吊在丝上死亡。表皮变色显著, 轻触易破, 流出褐乳色脓汁, 无臭气。5—6龄幼虫感染后, 多数体节缩短, 不蜕皮, 不化蛹而死亡。症状较轻者虽能化蛹, 但在蛹期死亡; 有的化成畸蛹后死亡。

罹病后期的幼虫血淋巴液混浊, 含有大量的多角体, 镜检能看到血细胞核显著膨胀, 核内充满多角体, 有的核膜破裂, 放出多角体(图I—3)。气管基质细胞核中也充

满多角体。

2. 致死中浓度 LC_{50} 的测定

感染后分别求出4天、9天及11天的致死中浓度，并计算感染 LC_{50} 的多角体数，以及死亡百分率的机率值（图1），并计算直线回归方程。

4天的致死中浓度为 $10^{-4.497}$ ，即787个PIB；

9天的致死中浓度为 $10^{-5.50}$ ，即243个PIB；

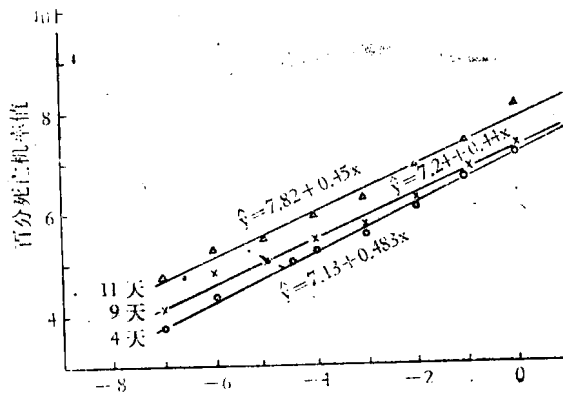


图1 大尺蠖感染NPV的 LC_{50} 。

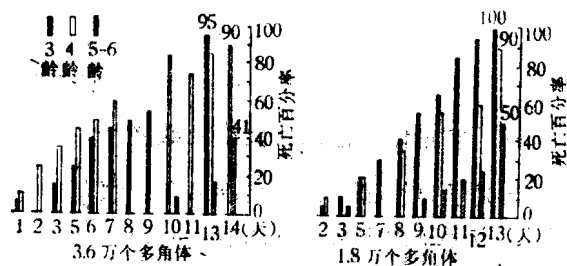


图2 不同虫龄对NPV的敏感性

11天的致死中浓度为 $10^{-8.621}$ ，即7个PIB；

从上结果可以看出接种病毒的浓度高时，潜伏期短，浓度低时，潜伏期相应延长。

3. 不同虫龄对NPV敏感性的测定

试验结果表明：5—6龄幼虫有一定的耐受性，累积死亡率为41.3—50%，而3—4龄幼虫的累积死亡率达到90%以上。同时3、4龄幼虫的50%死亡率比5、6龄幼虫的50%死亡率提早3—7天出现（图2）。

喂食3.6万个PIB与1.8万个PIB对各龄幼虫的致病力差别不大。

4. 不同感染方法对致病力的影响

病毒粒子以注射及滴喂两种方法感染大尺蠖，均能使其染病致死，死亡率为97—98%。其直线回归方程：微量注射组直线回归方程 $\hat{y} = 2.542 + 4.811x$ ；微量滴喂组直线回归方程 $\hat{y} = 3.08 + 3.354x$ 。前者比后者死亡快，注射者第8天死亡率为97%，滴喂者需13天死亡率才达到97%（图3），这可能由于消化道中有某种抑制病毒的物质或屏障所致（有贺久雄，1973）；也可能是病毒粒子在幼虫肠道内有阶段感染与增殖的过程，因而延长了死亡的时间。

微量滴喂多角体组的死亡率达到100%，其直线回归方程为 $\hat{y} = 4.702 +$

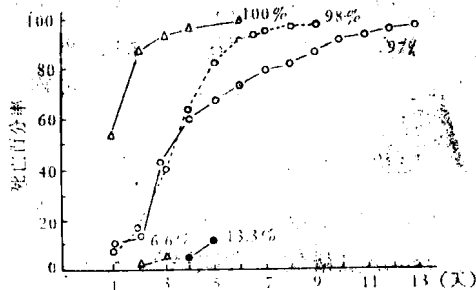


图3 病毒粒子与多角体的不同感染方法
○—○滴喂病毒粒子 □—□注射病毒粒子
△—△滴喂多角体 ◇—◇注射多角体
●—●滴喂水（对照）

3.992x。但注射多角体则不能引起幼虫感染致病(图3),与有贺久雄(1973)报道的家蚕NPV的多角体在体液中不溶解的结果相似。

5.化学药剂与NPV的混用试验

试验结果表明,与硫酸铜混用杀虫效果最好,6天全部死亡;尿素次之,10天死亡率为100%;与敌敌畏,过磷酸钙及硫酸亚铁混用效果不如对照(表2)。茶园内使用硫酸铜可兼治病菌,使用尿素也具有叶面施肥的作用。

五、大田防治效果

普杀试验区罩笼定点观察结果见图4,第1天开始死亡,第12天死亡率为51.7%,

23天为98.3%,病虫不蜕皮,发育缓慢。5、6龄幼虫感染后虫体萎缩,不化蛹而死亡。

点杀试验区定点观察见图5。第8天发现死虫,10—11天内死虫出现高峰(55.7%),以后死虫逐渐减少,有效长的潜伏期(与NPV的浓度有关)和再次感染的现象,直到32天才全部死亡。在50米长的茶树地段,

共观察到309头3—6龄大尺蠖,死亡率为98.4%。挖到5只蛹,化蛹率为1.6%。非定点对照区50米长茶树地段共挖到蛹18只,为试验区的3.6倍。

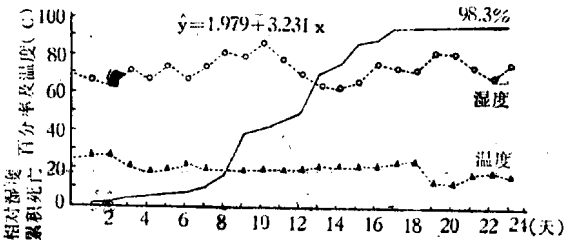


图4 罩笼定点杀虫试验

表2 化学药剂与NPV混用试验结果

组、别	虫数	天 数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
硫酸铜 与NPV	15	累积死虫数	1	0	9	12	14	15					
		死亡百分率(%)	6.6		60	80	93.3	100					
硫酸亚铁 与NPV	15	累积死虫数	1	2	0	5	7	8	11				
		死亡百分率(%)	6.6	13.3		33.3	46.6	53.3	73.3				
过磷酸钙 与NPV	15	累积死虫数		1	0	3	4	5	7	0	9		
		死亡百分率(%)		6.6		20	26.6	33.3	46.6		60		
尿 素 与NPV	15	累积死虫数		1	0	5	7	13	0	0	0	15	
		死亡百分率(%)		6.6		33.3	46.6	86.6				100	
敌敌畏 与NPV	15	累积死虫数		1	2	4	6	9	10	0	0	0	12
		死亡百分率(%)		6.6	13.3	26.6	40	60	66.6				80
明 矾 与NPV	15	累积死虫数		2	0	0	5	7					
		死亡百分率(%)		13.3			33.3	46.6					
水与NPV (对照)	15	累积死虫数		4	9	13							
		死亡百分率(%)		26.6	60	86.6							

普杀第一代大尺蠖后，第二代大尺蠖发生时（9—11月）试验区很难找到大尺蠖。个别茶树上有1—2龄的幼虫，几天后也全部消失。这种现象值得注意，可能是使用了大尺蠖NPV之后产生的后效作用

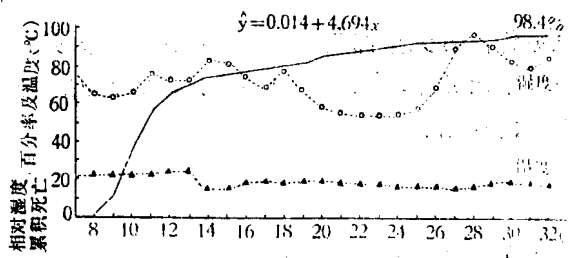


图5 无罩笼定点杀虫试验

1979年5—6月的室内杀虫试验见表3，NPV组的校正死亡率为100%，敌敌畏组与对照组的校正死亡率（99.19%及16.94%）高。若把NPV组总虫数减去非NPV的死虫数，敌敌畏组总虫数减去感染NPV的死虫数，然后计算校正死亡率，NPV组仍为100%，敌敌畏组为

99.19%，仍可看出施用NPV的杀虫效果高于敌敌畏。

表3 室内杀虫效果试验（5月27日—6月2—8日）

组别	试验虫数(头)	试验结果					
		NPV死虫		非NPV死虫		死虫总数	校正死亡率(%)
		死虫数	百分率(%)	死虫数	百分率(%)		
NPV	156	137	87.82	19	12.17	156	100
NPV 硫酸铜	133	94	70.67	39	29.32	133	100
敌敌畏	150	7	4.67	142	94.67	149	99.33
对照	177	17	9.6	13	7.34	30	16.94

茶园杀虫试验见表4。使用NPV的两组死亡率为98.97%及99.80%，敌敌畏组为77.55%，对照组虫口上升36.16%。经生物统计分析NPV组与敌敌畏组的死亡率有明显差异。试验结束后，继续观察其扩散作用。敌敌畏组及对照组周围的保护区内大尺蠖陆续感染NPV病全部死亡，证明NPV有扩散作用

表4 茶园杀虫试验（5月24日—6月6日）

组别	试验前活虫数(头/亩)	试验结果		
		活虫数(头/亩)	死虫百分率(%)	校正死亡率(%)
NPV	38671	533	98.61	98.97
NPV 硫酸铜	73,609	186	99.74	99.80
敌敌畏	19,202	5,867	69.44	77.56
对照	19,000	25,870	-36.15	

参 考 文 献

- 中国农业科学院茶叶研究所 1973 茶树病虫害防治。农业出版社。12—3 页。
朱弘复等 1975 蛾类图册。科学出版社。116 页。
朱国凯等 1979 大尺蠖杆状病毒粒子观察。科学通报 24 (8) : 372—3。
有贺久雄 1973 《蚕丝科学和技术》日本蚕病研究动态 (江苏省蚕业研究所译)
31—41。

陈常铭等译 1955 研究昆虫疾病及 应用微生物学方法保护植物指南。科学出版社。42 页。

Fenner, F. 1976 Classification and Nomenclature of Viruses. Second Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Intervirology., 7 : 1—116.

Reed, C. J. and H. Muench 1938 A simple method of estimating fifty per cent endpoints, Amer. J. Hyg., 27 : 493.

STUDIES ON THE NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS OF BUZURA SUPPRESSARIA

GAN YUN-KAI

(Hunan Institute of Microbiology)

In 1977 this nuclear polyhedrosis virus was isolated from the dead larvae of *Buzura suppressaria* Guenee in the tea garden of Wang Ling, Hunan. Under ordinary and phase contrast microscopes the polyhedra were seen as nearly rounded, rhombic, trigonal and hexangular particles and 1.2 to 3.6 μ in size. Under the electron microscope, the viron rods liberated from the polyhedra in 0.01 M Na_2CO_3 and 0.05 M NaCl measured 49—63 nm by 251—282 nm. This virus belongs to subgroup A of Baculovirus.

Oral administration of the virus on leaves by the larvae of the fourth and fifth instars showed the medium lethal concentration (LC_{50}) to be $10^{-4.497}$ (787 PIB) on the fourth day, $10^{-5.0}$ (243 PIB) on the ninth day, and $10^{-5.251}$ (7 PIB) on the eleventh day. Young larvae were more susceptible to the virus and different routes of virus infection caused different mortality rate.

Field test showed the mortality rate of the larvae may reach 98% after spraying with the polyhedral suspension and some infective effect on the later generations may appear.

油桐尺蠖核型多角体病毒的提取

甘运凯 谢怀晰 黄家萱 李秋云 李伯勋

提取多角体病毒的方法, 在一些专著和有关文献中均有叙述^[1, 2]。大致为收集感病虫尸、捣碎过滤, 然后用差异离心及密度梯度离心分离。但具体应用到提某一种多角体时还需要通过试验来确定和改进其中的各个环节。本文报告我们为获得油桐尺蠖核型多角体病毒所采用的两种方法。

材 料 和 方 法

一、材 料 室内感病死亡虫尸

二、方 法

1. 多角体的分离: 将虫尸用无菌水浸泡, 让其在室温下醇解, 将醇解后的虫尸放入高速组织捣碎机捣碎30'—45分, 将匀浆液静置数天, 下部自然沉降出一层灰白色多角体沉淀。该沉淀用下列方法处理直接可得到纯净制品。即用注射针头小心吸取沉淀于离心管内, 兑无菌水, 以500rpm 5分钟, 去沉渣取上清, 上清液经4000rpm离心30分钟, 收集到沉淀用无菌水稀释, 以4000rpm离心30分钟, 如此两轮次, 镜检其沉淀为效纯的PIB。再经30%、60% (W/W) 蔗糖梯度液, 以4000rpm离心30分钟的处理, 取60%层加一倍体积的磷酸缓冲液 (PH7.2) 洗涤, 4000rpm离心30分钟, 两轮次, 镜检, 此为效纯的多角体, 保存于4℃备用 (图1)。

作制剂用品或一般粗提则用下法。将匀浆液经尼龙袋过滤, 滤渣用去离子水反复冲洗, 避免多角体的损失。滤液经500rpm离心5分钟, 收聚组织块备用。上清液用3800rpm—400rpm离心30分钟收集, 倾去上清液, 收集的多角体沉淀加去离子水经4000rpm离心30分钟, 弃上清。如此重复3次 (见图2)。将所得灰白色多角体沉淀物再加入1:1的丙酮置磁力搅拌器中搅拌5分钟, 弃去丙酮, 然后用少量无菌水洗涤数次, 制成悬液, 再用磁力搅拌器搅拌5分钟, 测量悬液体积, 取悬液一毫升, 以10倍稀释法稀释, 用血球计数板计数3—4次, 取其平均值, 以测定出悬液中PIB量。镜检悬液, 内含大量PIB, 且有少量组织碎片, 留作制剂用。

3. 粗提各步骤中多角体损失量的测定

首先将滤液测体积, 取一毫升以10倍稀释法稀释, 并用血球计数板计数, 计算出滤液中PIB总量, 再把提取, 洗涤时各次废液残渣分别收集, 以上述方法稀释, 计数, 检测各步PIB损失情况。最后, 把收集到的灰白色PIB悬液用上法稀释, 计数得到总收获量。

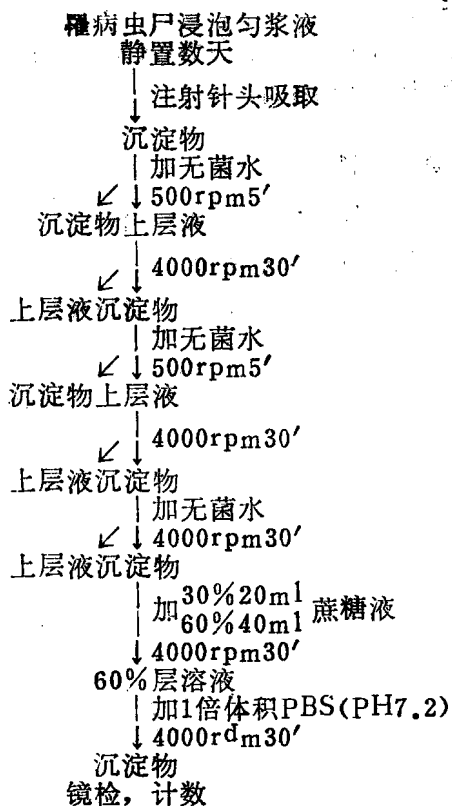


图1 蔗糖提取

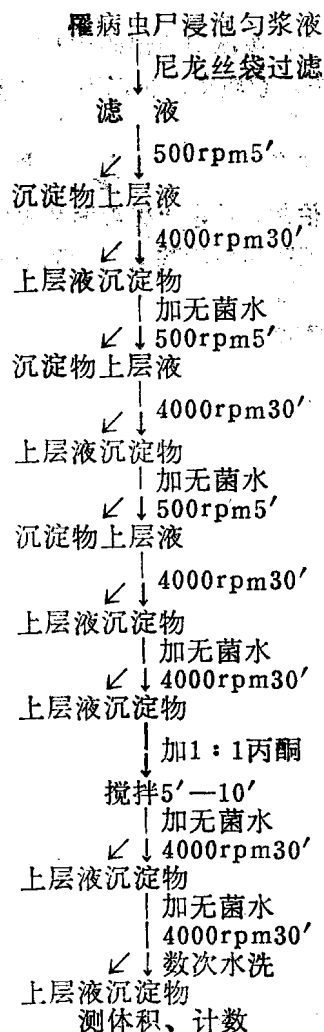


图2 纯水提取

结 果 和 讨 论

1. 由清水提取过程获得的灰白色多角体沉淀, 仍含有少量组织碎片, 用作大田防治试验时, 不影响防治效果, 可对病毒起一定的保护作用。

2. 在测定提取过程多角体损失的试验中, 测得滤液中多角体的总量为107043.5亿, 多角体收获总量为84578.75亿, 收获率为79.01%。废渣中多角体量为9012.5亿, 即残存率为8.42%, 洗水液中多角体量为1463.19亿, 即残存率为1.39%, 检测过程中出现的误差占总数的11.2%。

3. 为检测收集、洗涤各步PIB损失情况, 取出500rpm上清液462毫升: 内含PIB总量为1481.75亿收集后废液中PIB含量为172.43亿, 沉淀第一次洗涤废水PIB含量为88.43亿, 第二次洗涤废水PIB含量为55.89亿, 第三次洗涤废水PIB含量为45亿, 呈依次递减, 说明反复用水洗涤, 多角体的损失不大。

4.废渣,废液中检出的PIB量小于滤液中PIB总量与收获总量之差,在于前者中PIB含量少,杂质多,色泽深,溶液混浊,计数无法精确进行。

参 考 资 料

- 1.哈伯尔, K等“病毒学基本技术” 1976 科学出版社 39—40
- 2.中国医学科学院流行病防治研究所: “常见病毒学实验技术” 1798
科学出版社 83—88

油桐尺蠖核型多角体病毒形态 及结构的电镜观察

甘运凯 黄家萱 李伯勋 谢怀晰 李秋 云

我们自1977年在网岭茶场发现油桐尺蠖罹病死尸之后,相继在湖南各地主要茶园及油桐林进行了调查和采集,先后又分离获得若干株油桐尺蠖核型多角体病毒,并对其中一部分不同分离株的形态结构,致病活力,作了观察和试验,〔1〕本文记叙我们所观察到的形态及结构。

材料及方法

、**毒株** 取用四个株分别编号为BSNPV—W, BSNPV—S, BSNPV—D, BSNPV—M。

多角体 经单虫感染增殖,然后分别用蔗糖密度梯度离心提纯。

电镜 日立H₆₀₀型,附扫描装置。

超薄切片机 瑞典LKBⅡ型。

多角体扫描用黄金喷镀标本,病毒粒子用磷钨酸负染,超薄切片用戊二醛及锇酸固定,树脂包埋,铅染〔2〕;电镜观察。

结果与分析

一、多角体的形态结构

喷镀后的多角体,在扫描电镜下的外部形态呈三角形、四边形、多边形、近圆形及椭圆形,角度钝、表面平滑、大小不一(图版II₁)。

从超薄切片看多角体也显多形态,测得多角体膜为269.1~543.0Å厚的电子稠密层,有的切面边缘平滑,有的边缘有内陷缺口,显示病毒粒子进入线痕迹,还可以看到膜层夹嵌着病毒粒子(图版II₁₅),表明粒子正在进入(图版II_{10, 11, 13, 16, 18})。

多角体蛋白质晶格排列整齐,不为病毒粒子的存在而扰乱,晶格相距约为43.42~81.48Å,蛋白质亚单位呈斜纹花样,菱形排列(图版II_{10A, 12})(见表1);有的为平行花样正方形排列(图版II_{15, 16})。

表1 多角体膜及晶格

株号	多角体的膜		多角体蛋白质晶格		
	厚度 $\text{\AA}$	进入钱	间距 $\text{\AA}$	花样	排列
W	290.4 ± 21.3	有	81.48	斜纹	菱形
S	235.0 ± 45.0	"	75.13	"	"
D	485.6 ± 57.4	"	53.74	平行	正方形
M	543.9 ± 72.8	"	43.42	"	"

多角体被碱液处理30分钟后,大部分膜溶解,尚未扩散的蛋白质呈致密点状(图版I₄, 7, 9),有的出现网状空洞(图版I₅, 6);在未溶解的部分膜中,有的出现折纹(图版I₅, 8, 9)。

二、病毒粒子的形态结构

经碱液处理及负染后的病毒粒子杆状形态清晰,有的一端或两端有小突起;少量病毒粒子呈V形、马蹄形(图版I₂₅)我们还从BSNPV—D株见到病毒粒子亚基组成裸露,现出螺旋“结构”(图版I_{7A})。

当套膜存在时病毒粒子大小为 $263.6 \sim 306.6 \times 70.3 \sim 81.5 \text{nm}$ 其中最长的为 346.7nm ,最粗的粒子为 123.3nm (见表2)。

表2 病毒粒子耗途后的形态

株号	形态	粒子大小 (nm)	最长粒子	最粗粒子
W	杆状有少量S、V形两端钝圆、有突起	$282.5 \pm 2.6 \times 76.8 \pm 2.5$	312.0	123.3
S	"	$267.6 \pm 4.0 \times 72.1 \pm 1.8$	291.9	85.2
D	"	$298.3 \pm 8.2 \times 73.0 \pm 3.0$	346.7	89.1
M	"	$295.8 \pm 4.1 \times 79.2 \pm 2.3$	340.0	122.2

延长碱液处理时间使套膜溶解可见核壳体,核壳体呈杆状,S状、V状等多种形态且效细,核壳体的电子密度高(图版I₃, 4)。有的核壳体出现溶解点,或开始断裂,有的核壳体断裂为圆形或椭圆形,还能看到有的核壳体正在脱离套膜(图版I₃, 4)。

从超薄切片看到的病毒粒子长宽为 $206.0 \sim 349.6 \text{nm} \times 63.9 \sim 77.4 \text{nm}$,核壳体形态清晰,两端切平长 $149.1 \sim 315.4 \text{nm}$,宽 $31.9 \sim 43.6$,套膜厚度为 $15.2 \sim 32.5 \text{nm}$ 左右(图版I₁₀, 12-16)(见表3)。

表 3 病毒粒子的超薄切片形态

	外 长 (nm)	外 宽 (nm)	核 壳 体			套 膜 厚 (nm)	病毒粒子	
			长 (nm)	宽 (nm)	两端		排列	包埋 类型
W	229.8 ± 7.4	73.2 ± 2.3	164.9 ± 15.8	34.1 ± 1.0	平切	20.0~32.5	随机	单粒
S	253.8 ± 17.3	71.3 ± 1.8	193.2 ± 14.6	32.7 ± 0.8	"	19.3~30.3	"	"
D	217.2 ± 11.2	65.3 ± 1.4	169.2 ± 22.1	34.9 ± 1.6	"	15.2~24.0	"	"
M	225.4 ± 11.8	57.1 ± 4.4	172.7 ± 17.4	30.7 ± 1.8	"	11.9~19.8	"	"

在每个多角体的超薄切片中都可以十分清楚地看到病毒粒子的横切面，及纵切面，横切面显示的外膜及内膜更为清晰（图版 I_{10, 12}）病毒粒子进入多角体的方式，有垂直向嵌入，和横卧向嵌入（图版 I_{10, 11, 15}），病毒粒子在多角体内随机分散排列。属于单粒包埋型。一个多角体中病毒粒子数目高的可达数十个之多。

从以上四个分离株的形态结构来看，它们之间无明显的差异，仅有多角体蛋白质亚单位排列方式略有不同，这种不同有无生物学意义，有待研究。

参 考 资 料

1. 甘运凯（1981）、昆虫学报 24（4）372—378
2. 洪涛主编：生物医学超微结构与电子显微镜技术（1980）科学出版社

油桐尺蠖核型多角体病毒核酸 多角体蛋白及某些特性的研究

王 鄂 生

(武汉大学生物系)

黄家萱 甘运凯

摘 要

油桐尺蠖是危害茶果等作物的害虫,为防治其害1977年我们曾从油桐尺蠖中分离出核型多角体病毒,并对其生物学性质进行了研究,近几年来进行了大面积的田间效果试验,杀虫效果良好,有应用价值。为今后进一步弄明其感染机制,对此病毒的核酸,多角体蛋白进行初步的研究。

本实验采用酚法从病毒中抽提出核酸,测得其紫外吸收曲线,显示为一典型的核酸分子,经Sepharese 2B柱纯化的制剂,在琼脂糖凝胶上进行电泳,用溴化乙锭染色得一条荧光带,表明为一DNA,且其分子大小与入噬菌体DNA相近约为 $\sim 4.0 \times 10^7$ 道尔顿,从A260/A230, A260/A280比值可见其纯度较高,由其T_m值(84.3℃)可知为双股DNA。

多角体蛋白粗制剂经Sepharese 6B或2B柱层析得两个峰。等电聚焦凝胶电泳分析6~9条带,显示出有可能是多种蛋白,氨基酸组成成分分析表明此确为蛋白质,但究属何种蛋白有待进一步研究。

前 言

油桐尺蠖是危害茶叶、油桐等经济作物的重要害虫,严重者可成灾,为防治虫害,1977年我们曾从罹病油桐尺蠖中分离出油桐尺蠖核型多角体病毒(Nuclear Polyhedrosis Virus of Buzura Suppressaria, 简称BS NPV)并对其生物学性质进行过研究,证明为一种核型多角体病毒(1),1980年通过了田间应用效果鉴定。杀虫效果良好,有应用价值。为了今后进一步弄明其感染机制,我们对此病毒核酸,多角体蛋白进行提纯,并对其理化性质进行初步的研究。

Bergold(2)最早报导家蚕核型多角体病毒,1963年Bergold(3)对此病毒进行了分