

昆虫学研究集刊

第 八 集

1988



中国科学院上海昆虫研究所编
上海科学技术出版社

1/8

昆虫学研究集刊

第八集

1988

《昆虫学研究集刊》编辑委员会

主 编	朱国凯
委 员	(按姓氏笔划为序)
	尹文英 孙仲康 朱湘雄 杜家纬 杨平澜 陈巧云 范滋德
责任编辑	金锦美
编 辑	姚运妹

昆 虫 学 研 究 集 刊

第 八 集

1988

中国科学院上海昆虫研究所编

上海科学技术出版社出版

(上海瑞金二路450号)

总发行所上海发行所发行 上海市印刷三厂印刷

开本 787×1032 1/16 印张 16 插页 4 字数 373,000

1990年 4 月第 1 版 1990年 4 月第 1 次印刷

印数 1—2,000

ISBN7-5323-1747-1/Q·32 定价: 6.10元

目 录

棉铃虫杆状病毒离体复制的研究 I 敏感细胞谱的观察·····	裘卫	张慧娟	朱国凯	(1)
棉铃虫杆状病毒离体复制的研究 II TN-368细胞感染后在超微结构上的变化 ·····	裘卫	任鸿林	朱国凯	(5)
上海地区柳二尾蚜对有机磷和拟除虫菊酯的抗药性 ·····	唐振华	庄佩君	韩启发	黎云根 (11)
三化螟对有机磷杀虫剂的抗性监测·····	韩启发	庄佩君	唐振华	(17)
由寄主植物的反应评价扰乱交配法的效果·····	陈元光	哪一平	黄昌本	唐祥冠 (23)
长兴岛桔园全爪螨和江原钝绥螨种群动态以及杀虫剂对它们的影响 ·····	罗志义	于国培	张燕玲	陈卓录 姚冬妹 徐国强 (33)
天目山自然保护区原尾虫区系及其变动规律的调查研究·····	尹文英	赵立军		(43)
西天目山森林土壤弹尾目昆虫变动规律的初步研究·····	赵立军	尹文英		(53)
落叶松八齿小蠹聚集信息素研究 I 聚集行为特征和活性物质提取 ·····	符文俊	祁云台	邱鸿贵	沈伯钧 伍祥德 (61)
落叶松八齿小蠹聚集信息素研究 II 聚集行为和寄主树关系 ·····	邱鸿贵	符文俊	祁云台	何丽芬 梁晓东 (67)
落叶松八齿小蠹活成虫性别判别方法的探讨·····	何丽芬	哪一平	符文俊	(73)
食料对螟长距茧蜂寄主玉米螟幼虫虫粪中利它素活性的影响 ·····	邱鸿贵	何丽芬	丁德诚	汪建琳 邱中良 沈伯钧 (77)
用性信息素监测棉田和玉米田亚洲玉米螟的发生期·····	杜家纬	许少甫	王梅珍	(83)
两种玉米螟电镜扫描比较与鉴定特征·····	陈小钰	钟文怡	张泰平	(89)
用大量诱捕法防治桑螵的初步研究 ·····	戴小杰	唐贤汉	朱俊伟	孟国华 杜家纬 董廷宣 杜明增 (95)
蓖麻蚕中肠 γ -谷氨酰转肽酶的分离、纯化和性质·····	尹明	林浩	陈淡贞	陈燕翔 (101)
家蚕增丝素的应用及其机理的研究·····	曹梅讯	蒋容静	李秀艳	谢德松 (113)
20-羟基蜕皮酮对淡色库蚊卵母细胞发育的影响: 功能与超微结构的研究 ·····	朱湘雄	吴载宁	陈志楠	(121)
双腰富阮精子和精子发生的研究及其在系统发生中的意义(原尾目) ·····	薛鲁征	尹文英		(125)
蚊帐浸泡氯菊酯对中华按蚊吸血及产卵率的影响·····	陈文美	刘金发	刘维德	(131)
抗马拉硫磷淡色库蚊不同基因型的比较适合度·····	张朝远	唐振华		(139)
氯化镭对淡色库蚊幼虫的毒性及其在体内的积累动态研究 ·····	姜家良	王素文	陈巧云	徐薇 林国芳 (147)

淡色库蚊对苏云金杆菌 H ₁₄ 的抗性选育·····	韩罗珍 (153)
研究昆虫行为用的风洞装置·····	唐贤汉 朱俊伟 杜家纬 (157)
聚乙二醇影响棉铃虫核型多角体病毒在同源细胞株中复制的初步研究 ·····	杨淑艳 巫蓓丽 (161)
副春蜓属一新种记述(蜻蜓目:春蜓科)·····	刘祖尧 (167)
小翼蝗属一新种记述(直翅目:蝗总科:剑角蝗科)·····	毕道英 (171)
西藏大蟹属一新种(等翅目:蟹科)·····	韩美贞 (175)
中国象蟹科一新属三新种·····	高道荃 何秀松 (179)
四川松针上一种新蛭虫(蛭总科:盾蛭科)·····	杨平澜 卢德惠 (189)
链蛭属一新种记述(蛭总科:链蛭科)·····	胡金林 孙平 陈君如 (193)
竹链蛭属一新种(蛭总科:链蛭科)·····	胡金林 谢国林 (196)
四川省草种蝇属一新种(双翅目:花蝇科)·····	范溢德 王宝林 杨祖堂 (199)
青海门源胡棘蝇属五新种一新亚种·····	范溢德 金翠霞 吴亚 (202)
蛇科亚科的系统演化(双翅目)·····	王天齐 (209)
岛甲螨属一新种(隐气门亚目:罗甲螨科)·····	胡圣豪 王孝祖 (217)
剑螽属的新种记述(直翅目:螽斯科)·····	夏凯龄 刘宪伟 (221)
天日山胡钹蚱属的一新种(双尾目:钹蚱科)·····	谢荣株 杨毅明 尹文英 (229)
[研究简报]	
一个新的杆状病毒——昆虫细胞体系研究初报·····	袁卫 朱国凯 (10)
松突圆蚧交配行为的研究·····	丁德诚 唐贤汉 杜家纬 潘务耀 连俊和 (88)
丝棉木抽提物对亚洲玉米螟生长和取食的影响·····	邱鸿贵 邱中良 符文俊 (94)
几种药用植物生取物对烟青虫和棉铃虫生长发育的影响 ·····	邵一平 符文俊 李文谷 (132)
用性信息素确定中国玉米螟分布的研究·····	唐贤汉 王梅珍 杜家纬 (235)
黄地老虎雌蛾性信息素释放率及其组分比例的测定 ·····	杜家纬 Christer Lofstedt Jan Lofqvist (237)
[综述]	
抗药性机理的分子生物学进展·····	姜家良 (239)

CONTENTS

Studies on <i>Heliothis armigera</i> Nuclear Polyhedrosis Virus (Ha NPV) Replicated <i>In vitro</i> I Sensitive Insect Cell Lines Range	Qiu Wei, Zhang Hui-juan & Zhu Guo-kai (1)
Studies on <i>Heliothis armigera</i> Nuclear Polyhedrosis Virus (Ha NPV) Replicated <i>In vitro</i> II the Ultrastructure of TN-368 Cell After Viral Infection	Qiu Wei, Ren Hong-lin & Zhu Guo-kai (5)
Resistances of <i>Cavariella salicicola</i> from Shanghai to OP and Pyrethroid Insecticides	Tang Zhen-hua, Zhuang Pei-jun, Han Qi-fa & Li Yun-gen (11)
Monitoring and measurement for the Paddy Bore Resistance to OP-Insecticides	Han Qi-fa, Zhuang Pei-jun & Tang Zhen-hua (17)
Investigation on the Formulation of Insect Semiochemical V Effect of Mating Disruption Evaluated by Response of Host Plant	Chen Yuan-guang, Li Yi-ping, Huang Chang-ben & Tang Xiang-guan (23)
Population Dynamics of Citrus Red Mites <i>Panonychus citri</i> Mcg. Along with Their Predatory Mites <i>Amblyseius eharai</i> Amitai & Swirki and Influences of Pesticide Application at the Citrus Orchard in the Changxing Island	Luo Zhi-yi, Gan Guo-pei, Zhang Yan-lin, Chen Cao-lu, Yao Dong-mei & Xu Guo-guang (33)
Soil Proturian Communities in Natural Preserve Area of the Tianmu Mountain, East China	Yin Wen-ying & Zhao Li-jun (43)
A Preliminary Study on Seasonal Changes in Collembolan Populations in the West Tianmu Mountain	Zhao Li-jun & Yin Wen-ying (53)
Studies on the Aggregation Pheromone of <i>Ips subelongatus</i> I Characteristics of Aggregation Behavior and the Extraction of Active Materials	Fu Wen-jun, Qi Yun-tai, Qiu Hong-gui, Shen Bo-jun & Wu Xiang-de (61)
Studies on the Aggregation Pheromone of <i>Ips subelongatus</i> II the Relationship Between Aggregation Behavior and Its Host Plant Tree	Qiu Hong-gui, Fu Wen-jun, Qi Yun-tai, He Li-fen & Liang Xiao-dong (67)
Distinctive Method for Sexes of Living <i>Ips subelongatus</i> (Coleoptera: Scolytidae)	He Li-fen, Li Yi-ping & Fu Wen-jun (73)
Effect of Diet on the Kairomonal Activity in Frass from <i>Ostrinia furnacalis</i> Larvae for Parasitoid <i>Macrocentrus linearis</i>	Qiu Hong-gui, He Li-fen, Ding De-cheng, Wang Jian-lin, Qiu Zhong-liang & Shen Bo-jun (77)
Seasonal Occurrence of Asian Corn Borer in Cotton and Corn Fields Monitor-	

ed by Sex Pheromone Trap ...	Du Jia-wei, Xu Shao-fu & Wang Mei-zhen(83)
The Comparison of Scanning Electromicroscopic Observation and Identification of Two Corn Borer.....	Chen Xiao-yu, Zhong Wen-yi & Zhang Tai-ping(89)
Preliminary Studies on Sex Pheromone Mass-Trapping for Control of Mulberry White Caterpillar, <i>Rondotia menciana</i> Moore	Dai Xiao-jie, Tang Xian-han, Zhu Jun-wei, Meng Guo-hua, Du Jia-wei, Dong Ting-xuan & Du Ming-zhen(95)
Purification and Properties of γ -glutamyl Transpeptidase from <i>Philosamia cynthia ricini</i> Midgut ...	Yin Ming, Lin Hao, Chen Dan-zhen & Chen Yan-xiang(101)
The Application of Silk Production Increasing Agent in Silkworm <i>Bombyx mori</i> and Its Mode of Action...	Cao Mei-xun, Jiang Rong-jing, Li Xiu-yan & Xie De-song(113)
Effect of 20-Hydroxyecdysone on Oocyte Development in the Mosquito <i>Culex pipiens pallens</i> : A Functional and Structural Study	 Zhu Xiang-xiong, Wu Zai-ning & Chen Zhi-fu(121)
The Ultrastructure of Spermatozoa and Spermatogenesis in <i>Fujientomon dicestum</i> (Insecta, Protura), with Special Reference to Its Significance on Phylogeny	 Xue Lu-zhen & Yin Wen-Ting(125)
Studies on Blood Feeding and Fecundity of <i>Anopheles sinensis</i> Exposed to Permethrin Treated Mosquito Nets.....	Chen We-mei, Liu Jim-fa & Liu Wei-de(131)
Comparative Fitness of Different Genotypes of Malathion-resistant <i>Culex pipiens pallens</i>	Zhang Zhao-yuan & Tang Zhen-hua(139)
Study on Toxic Effect and Accumulation of Cadmium Chloride in Mosquito Larvae <i>Culex pipiens pallens</i>	 Jiang Jia-liang Wang Su-wen, Chen Qiao-yun, Xu-Wei & Lin Guo-fang(147)
Selection of Resistance to Biological Insecticide, <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>rsaelensis</i> in <i>Culex pipiens pallens</i>	Han Luo-zhen(153)
Wind Tunnel in Insect Behavioral Research	 Tang Xiang-han, Zhu Jun-wei & Du Jia-wei(157)
Effect of Polyethylene Glycol on <i>Heliothis armigeru</i> Nuclear Polyhedrosis Virus Replication in Vitro	Yang Shu-yan & Wu Pei-li(161)
On A New Species of the Genus <i>Parpagomphus</i> from China (Odonata: Gomphidae)	Liu Zu-yao (167)
Description of A New Species of the Genus <i>Paragonista</i> Willemse (Orthoptera: Acridoidea: Acrididae)	Bi Dao-ying(171)
A New Species of the Genus <i>Macrotermes</i> from the Xizang Autonomous Region (Tibet), China (Isoptera: Termitidae)	Han Mei-zhen(175)
Three New Species of the New Genus <i>Mironasutitermes</i> from China (Isoptera: Termitidae, Nasutitermitinae	Gao Dao-rong & He Xiu-song(179)

- A New Scals Insect on Pine Needles from Sichuan (Coccoidea: Diaspididae)
..... Young Bainley & Ln Dehui(189)
- A New Species of *Asterolecanium* (Homoptera: Coccoidae Asterolecanidae)..
..... Hu Jin-lin, Sun Ping & Chen Jin-ru(193)
- A New Species of *Bambuspis*(Homoptera: Asterolecanidae)
..... Hu Jin-lin & Xia Guo-lin(196)
- A New Species of the Genus *Phorbia* from Sichuan, China (Diptera: Anthomyiidae) Fan Zi-de, Wang Bao-lin & Yang Zu-tang(199)
- Five New Species and One New Subspecies of the Genus *Pogonomyia* Rondani (Diptera: Muscidae) from Menyuan, Qinghai, China
..... Fan Zi-de, Jin Cui-xia & Wu Yar(202)
- The Phylogeny of Three Subfamilies of Tabanidae (Diptera)
..... Wang Tiang-qi(209)
- A New Species of *Nesiocarus* (Cryptostigmata: Lohmannidae)
..... Hu Sheng-hao & Wang Xiao-zu(217)
- Description of New Species of the Genus *Xiphidiopsis* (Orthoptera: Tettigoniidae) Xia Kai-ling & Liu Xian-wei(221)
- A New Species of *Rarajapyx* from the Tianmu Mountain, China (Diplura: Japygidae)Xie Rong-dong, Yang Yi-ming & Yin Wen-ying(229)

BRIEF REPORT ON RNSEARCH

- Primary Repoat of Studies on A New Baculovirus—Insect Cell Line System Qiu Wei & Zhu Guo-kai(10)
- Mating Behavior of *Hemiberlesia pitysophila* Takagi (Homoptera: Diaspididae)
...Ding Ce-cheng, Tang Xian-han, Du Jia-wei, Pan Wu-yue & Lian Jun-he(88)
- Effects of *Euonymus bungeanus* Extracts on Growing and Feeding-of *Osirinia furnacalis* Qiu Hong-gui, Qiu Zhong-liang & Fu Wen-jun(94)
- Influences of Some Extracts of Medecinal Plants on Development of *Heiothis assulta* and *H. armigera*Li Yi-ping, Fu Wen-jun, & Li Wen-gu(132)
- Studies on the Distribution of Corn Borer in China Determined by Sex Pheromone componentsTang Xian-han, Wang Mei-zhen & Du Jai-wei(235)
- Determination of Release Rates and Proportion of 3-Components of Sex Pheromone of Turnip Moth *Agrotis segetum*
..... Du Jia-wei, Christer Lofstedt & Jan Lofqvist(237)

REVIEW

- Rcsearch Progress on Molecular Biology of Insecticide Resistance
..... Jiang Jia-liang(239)

棉铃虫杆状病毒离体复制的研究 I 敏感细胞谱的观察

袁 卫 张慧娟 朱国凯

(中国科学院上海昆虫研究所)

摘要 本文用国内外目前已建立的多株昆虫连续细胞系对棉铃虫杆状病毒(Ha NPV)离体复制的寄主细胞谱作了研究。病毒离体复制的敏感寄主细胞谱广,它在鳞翅目五个属的六个昆虫细胞系内均可增殖复制,产生出明显的细胞病变(CPE)。从中可以确立起最为敏感的棉铃虫杆状病毒——昆虫细胞体系。并对 Ha NPV 离体复制敏感细胞谱以及它在同源和异源细胞内复制问题作了探讨。

关键词 棉铃虫杆状病毒 细胞谱

从七十年代中期起,棉铃虫杆状病毒[*Heliothis armigera* Nuclear Polyhedrosis Virus, (Ha NPV)]由于对寄主专一性强,感染力又高,对哺乳类动物及其建株细胞,甚至对非寄主性昆虫均无作用^[1],就直接被用来防治棉田害虫,不但效果显著,而且具有重要的经济价值和生态效益^[2]。在离体条件下其增殖复制的状况也十分引人注目。本文用国内外目前已建立的多株昆虫连续细胞系对 Ha NPV 离体复制的寄主细胞谱作了研究后发现:病毒离体复制的敏感寄主细胞谱广,它在鳞翅目五个属的六个昆虫细胞系内均可增殖复制,产生出明显的细胞病变(CPE)。从中可以确立最为敏感的棉铃虫杆状病毒——昆虫细胞体系。为设计离体增殖生产 Ha NPV 提供了一条切实可行的途径。

材 料 和 方 法

一、细胞

选用棉铃虫幼虫血细胞SIE-HAH-806、粘虫(*Mythimna separata*)幼虫血细胞SIE-MSH-805^[4]、茶尺蠖(*Ectropis oblique*)蛹卵巢组织建株的SIE-EO-801^[5]、桑毛虫(*Eupragotis similis*)幼虫血细胞(刘栖干待发表)、草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)蛹卵巢组织的IPLB-SF-21AE、粉纹夜蛾(*Trichopusia ni*)卵巢组织建株的TN-368细胞和由我们实验室从IPLB-SF-21AE细胞中克隆建株的IPLB-SF-21AEC。IPLB-SF-21AE和TN-368细胞均由Vaughn博士惠赠^[6]。以上七个细胞系在我们实验室条件下已分别传代200代次以上的记录。细胞传代方法均如前所述^[6]。

二、病毒

棉铃虫杆状病毒(Ha NPV VHA-273)原始毒种由华中师院生物系提供,按照文献^[7]

方法得到第一代病毒后,又在TN-368细胞中传代扩增,收取感染细胞上清液,分装于1ml安瓶内,置-80℃冰箱保存,临试验前经TCID₅₀滴定后,作为毒种。本研究全部采用第五代病毒。

三、病毒感染性研究方法^[3]

1. 相差显微镜下检查细胞病变(CPE) 将TCID₅₀为10⁴/ml Ha NPV 分别接种新传代的IPLB-SF-21 AEC、SIE-MSH-805、TN-368、IPLB-SF-21 AE、SIE-Es-1、SIE-HAH-806和SIE-EO-801。待病毒吸附1小时后,轻轻倒去培养液,再用各自的培养液洗两遍,然后恢复到每瓶细胞2ml培养液,放置28℃下培养。每个试验组各接种5瓶细胞,同时设未加任何处理的空白细胞对照。接种病毒后,在相差显微镜下逐日检查细胞病变情况,直至第21天后。

2. 细胞超薄切片检查病毒复制情况 分别取接种Ha NPV 2、3、5、7、14、21天后的上述七个细胞培养物,经500 G离心15分钟,取沉淀细胞,经2.5%戊二醛和2%四氧化锇固定,用不同浓度的酒精分级脱水,最后用环氧树脂812包埋剂混液包埋,置LKBⅡ型超薄切片,染色后置JEM 200CX电镜下观察。

结果与讨论

一、能离体复制Ha NPV的敏感细胞谱

Ha NPV VHA-273是我国筛选出的强毒株。用它进行大田防治棉铃虫,虫口减退率接近100%。Ha NPV的活体寄主谱研究表明,它对草蛉、粘虫、粉纹夜蛾等13种幼虫无感染作用。但是,Ha NPV离体复制的情况却不同了。它在除SIE-EO-801细胞外的其余6个昆虫细胞中均能产生明显的细胞病变(CPE)并复制出新的病毒。如IPLB-SF-21AEC细胞感染病毒后,表现为体积增大,形成多个折光性极强的多角体(图版Ⅱ 1,2)。SIE-MSH-805感染后则表现为细胞形态发生显著改变,从正常的梭形变为球形,且有多角体形成(图版Ⅱ 3,4)。电镜下受感染的细胞核内,有病毒基质(Vs),继而出现成熟的病毒杆,并被埋入到多角体之内。如在TN-368细胞核内的单个多角体内就可埋入50束以上的病毒杆(图版Ⅱ 5)。

总结国内外研究杆状病毒的寄主谱结果大致有三种情况:1.病毒的活体和离体的寄主谱是一致的。如草地夜蛾杆状病毒既能使幼虫致病,又能在同源细胞系中复制;2.病毒可引起寄主罹病,但在同源连续细胞内则不复制。如粘虫杆状病毒;3.病毒离体复制的寄主细胞谱比活体要广泛得多。如本文研究的Ha NPV。实验证明:Ha NPV是继苜蓿丫纹夜蛾杆状病毒(Ac NPV)后的又一具广谱寄主细胞谱的昆虫杆状病毒。其机理尚有待深入研究,但这些事实无疑对欲建立新的杆状病毒——昆虫细胞体系提供出具实际意义的线索。

二、病毒在同源和异源细胞内复制的比较

昆虫杆状病毒的感染性常表现在种的特异性上。因此,常规总是以同源细胞系来复制病毒。但是,就目前所积累的有关杆状病毒离体复制的资料来看,要重新改变对杆状

病毒的同源和异源的认识。杆状病毒离体复制的优劣是以单位细胞内复制出病毒杆数量、形态和感染力为依据的。例如国际上公认的最敏感的杆状病毒——昆虫细胞体系是苜蓿丫纹夜蛾杆状病毒(Ac NPV)和异源的粉纹夜蛾TN-368细胞；粉纹夜蛾杆状病毒在同源的TN-368细胞内长期连续传代复制后，出现病毒形态变化和感染性下降的问题^[7]。但是Ac NPV在异源的IPLB-SF-21AE细胞内同样传代复制50代后，仍具有正常形态和感染力^[3]。本文研究的Ha NPV在同源的SIE-HAH-806内使40%左右的细胞形成多角体，与McIntosh报道的谷实夜蛾杆状病毒(与Ha NPV不同种)在同源的三株细胞系中感染力一致^[8]。但是，Ha NPV在TN-368中使几乎100%细胞复制出子代病毒。杆状病毒的离体复制受病毒与细胞之间的介导信息，即细胞膜表面的病毒受体、细胞的容许性、温度、pH、培养基等诸因素的影响。从这一观点出发，对今后建立新的昆虫细胞系，不一定要强调其同源性，有时或许异源的更好。

参 考 文 献

- [1] 裘卫、朱国凯。1986。昆虫杆状病毒对人和猴四个建株细胞的接种试验。昆虫学研究集刊，第六集，129—134。上海科学技术出版社。
- [2] 裘卫、朱国凯。1987。应用昆虫杆状病毒防治害虫。生物防治通报，3:39—43。
- [3] 裘卫、朱国凯。1987。苜蓿丫纹夜蛾杆状病毒在四个异源连续细胞系内的传代复制。病毒学报，3:259—263。
- [4] 沈立美、刘栖干。1983。粘血细胞的建株报道。昆虫学研究集刊，第三集，123—128。上海科学技术出版社。
- [5] 刘栖干等。1981。茶尺蠖蛹卵巢细胞株的建立。昆虫学研究集刊，第二集，121—128。上海科学技术出版社。
- [6] 朱国凯、张慧娟。1984。苜蓿夜蛾核型多角体病毒对六个昆虫建株细胞的感染试验。昆虫学研究集刊，第四集，145—149。上海科学技术出版社。
- [7] Mackinnon, E.A.; et. al. 1974 Morphogenesis of Nuclear Polyhedrosis Virus under Conditions of Prolonged Passage *in vitro*. *J. Ultrastructure Research* 49, 419—435.
- [8] McIntosh, A.H.; et. al. 1981 Replication and Infectivity of the Single-Embedded Nuclear Polyhedrosis Virus, *Baculovirus heliothis* in Homologous Cell Lines. *J. Inverte. Pathol.* 37: 258—264.

STUDIES ON *HELIOTHIS ARMIGERA* NUCLEAR POLYHED- ROSIS VIRUS (HA NPV) REPLICATED *IN VITRO* I SENSITIVE INSECT CELL LINES RANGE

Qiu Wei Zhang Hui-juan Zhu Guo-kai

(Shanghai Institute of Entomology, Academia Sinica)

This paper studied the continuous insect cell lines range of replication of *Heliothis armigera* Nuclear Polyhedrosis Virus (Ha NPV) *In Vitro*. These cell lines were established at home and abroad. Not only had Ha NPV its replication but also induced Cytopathogenic Effect (CPE) and polyhedrons in *Trichopusia ni* TN-368; *Spodoptera frugiperda* IPLB-SF-21AE and its clone cell line IPLB-BF-21AEC; *Euproctis similis* cell line; SIE-Es-1; *Mythimna seperata* SIE-MSH-805 and *Heliothis armigera* SIE-HAH-806 insect cell lines those from five Lepidoptera genera. The most sensitive Ha NPV—insect cell line was established among these cell lines.

Key words *Heliothis armigera* Nuclear Polyhedrosis Virus Insect cell line
range

棉铃虫杆状病毒离体复制的研究II TN-368细胞感染后在超微结构上的变化*

袁 卫 任鸿林 朱国凯

(中国科学院上海昆虫研究所)

摘要 本文对棉铃虫杆状病毒(Ha NPV)感染TN-368细胞的超微结构变化作了动力学的描述和解释:1.病毒感染24—48小时后,细胞核内出现具有特征性的环带状病毒基质与发夹结构(Hc),前者是形成病毒DNA、蛋白质衣壳和病毒套膜的物质基础;后者与核衣壳的形成、加工、装配和成熟有关;2.48小时后,裸露的和套膜的病毒杆充盈整个细胞核,核正常结构消逝;而胞浆内线粒体、内质网和高尔基体等细胞器结构仍然存在。与此同时,细胞核内出现了多角体结构,并有病毒杆埋入,96—120小时后,每细胞核内多角体数目可达最大值,少则3—5个,多则20—30个,单个多角体内可埋入50根以上的病毒杆。病毒杆的埋入至少要有两个条件:其一,病毒杆的埋入发生在多角体发育的某一特定阶段;其二,套膜病毒与多角体之间有识别信号;3.核衣壳的释放存在两种方式:即病毒杆通过细胞膜的芽生方式和病交细胞破裂崩解的溶细胞方式。

在Ha NPV——TN-368细胞体系中,病毒感染率高,几乎100%细胞都能复制出子代病毒,而且每细胞多角体产量高,以埋入型病毒(OV)占优势,是理想的新杆状病毒——昆虫细胞体系。

关键词 棉铃虫杆状病毒 TN-368细胞 复制 超微结构

棉铃虫杆状病毒[*Heliothis armigera* Nuclear Polyhedrosis Virus, (Ha NPV)] 是我国已应用于棉田害虫生物防治的一种十分有效的微生物杀虫剂^[1]。对 Ha NPV在虫体和同源寄主原代培养细胞上的感染试验及其形态发生,也已有不少初步的报道^[6]。能否利用昆虫连续细胞系以一定规模的方式来生产杆状病毒,已有人作了不少的努力^[16]。另外,随着杆状病毒——昆虫细胞体系在表达外源性基因产物上的特殊作用^[14],因此,对于病毒在离体细胞内复制动态方面的详尽了解,均能为完善杆状病毒——昆虫细胞体系积聚下可靠的基础资料。本文对Ha NPV在七株寄主细胞内复制比较研究的基础上^[3],选出了最为敏感的 Ha NPV——TN-368细胞体系为主要对象,进一步深入研究病毒复制动态过程和细胞在超微结构上的病理变化。在该体系中,病毒感染率极高,几乎100%细胞都能接受病毒的感染,而且在后期每个细胞中多角体数量也多,大都以埋入型病毒(OV)占优势,因此,这是一个较为理想的新的杆状病毒——昆虫细胞体系。现将结果报道如下。

* 袁明、徐祖国两同志协助照片制作,在此鸣谢。

材料和方法

一、细胞和病毒

粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) TN-368细胞由国外引进^[7], 培养液为TNM-FH 培液, 含10%小牛血清, pH调至6.2, 细胞分瓶传代比例为1:10, 按此比例, 每瓶细胞在开始生长的密度为 $1.5 \times 10^5/\text{ml}$ 。

Ha NPV VHA-273 毒株由华中师院生物系提供。按照前法^[4]得到第1代病毒后, 然后再在 TN-368细胞内扩增, 本研究一律采用第10代病毒。经TCID₅₀^[2]滴定后, 作为接种物。

二、感染方法

取TCID₅₀为 $10^5/\text{ml}$ 的 Ha NPV 接种新传代的 TN-368细胞, 待其吸附1小时后, 用TNM-FH培液洗涤两遍, 然后再恢复到每瓶细胞2ml培养液。将接种病毒后的培养物分不同时间(8, 12, 24, 30, 36, 48, 72, 96, 120和168小时)从28℃培养箱内取出, 用吸管将贴壁细胞轻轻吹打下, 500G离心15分钟, 弃去上清液, 沉淀细胞经固定制作电镜标本。同时设未加病毒处理的 TN-368细胞作为对照。

三、电镜标本的制作

按上海第二医科大学电镜室常规方法^[8]稍加修改。用2.0%戊二醛(0.2mol/L二甲砷酸钠缓冲液, pH7.4)和1%锇酸双重固定后, 经梯度(30%—100%)酒精脱水, 环氧树脂812包埋, LKB Ⅱ超薄切片, 醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色, 然后置JEM200 CX电镜下观察。

结果和讨论

一、病毒基质(Vs)

TN-368细胞感染 Ha NPV 24小时后在超微结构上出现变化。首先可观察到细胞核明显增大, 核仁消逝; 随之一种电子密度强的纤维样物质(病毒基质)布满整个核的部位(图版Ⅳ1)。36小时后, 在病毒基质边缘萌发衍生出裸露的病毒杆(图版Ⅳ2)。48小时后, 上述的纤维样物质进一步凝集紧缩, 形成具有特征性的环带状病毒基质(图版Ⅳ4)。在它的周围常有一种电子致密度强的, 排列有序的酷似发夹的结构(Hc)(图版Ⅳ4, 图版Ⅴ13, 15, 16), 该结构与尔后病毒杆的形成和成熟有着极为密切的关系。此时, 核内正常结构完全消失, 充溢了裸露的和有套膜的病毒杆(图版Ⅳ3), 并有局部的病毒晶格排列(图版Ⅳ4, 5, 6)。但是在胞浆内, 仍有线粒体(图版Ⅳ7), 内质网和高尔基体等细胞器结构存在。病毒杆可在核内(图版Ⅳ4)或以芽生形式释放出细胞外时(图版Ⅳ8)获得套膜。

有关NPV 感染后的病毒基质问题, Harrap曾作过较为详细的叙述和解释^[7, 12], 并且指出病毒基质的体积大小和电子密度的强弱与随后出现病毒杆数量的多寡成平行关系^[13]。我们支持 Harrap的观点, 并认为病毒基质孕育着形成完整病毒所需要的全部内

容,包括病毒的 DNA、蛋白质衣壳和外层套膜;NPV 的发生、套膜和成熟的整个过程均在核内完成,这从病毒形态发生的直观资料就可得到证实。我们还观察到一种发夹结构(Hc),它在病毒基质形成的同时或稍后出现,它与核衣壳的形成、加工、装配和成熟有关。

二、多角体的形成和病毒杆的埋入

48 小时后,细胞核内就有多角体结构,有的病毒杆正在被埋入到多角体中去(图版 IV 3);只有具套膜的病毒杆方可被埋入。我们把埋入到多角体之内的病毒称之为埋入型病毒(Occluded Virus, (OV)(图版 V 9, 11);而把未埋入到多角体之内的各种具套膜的成熟病毒,包括核内、胞浆内和细胞外游离的病毒,统称为未埋入型病毒[Nonoccluded Virus, (NOV)]。多角体在核内形成的高峰于感染 96—120 小时后。电镜下,几乎每个细胞核内都有新复制的病毒杆,核内有多角体,少则 3—5 个,多则 20—30 个,多角体可填满整个核的位置,而且以埋入型病毒(OV)占优势(图版 V 9)。有的多角体中可埋入 50 束以上的病毒杆(图版 V 11),病毒杆的埋入并不破坏多角体蛋白的晶格排列(图版 V 12)。尽管多角体内已埋入许多束病毒杆,但是在它周围还有许多游离的待埋入的成熟病毒杆(NOV)(图版 V 9)。

Summers^[15]和 Chung^[9]曾分别对多角体的形态发生作过描述。但是 Hamm^[10]提出了质疑。我们的观察结果与前者基本一致,多角体的发育始于电子致密度高的纤维丝物质,然后,该物质收缩、凝固^[5]。我们在反复地观察了病毒杆埋入到多角体内的过程后认为:病毒杆的埋入有两个特点:其一,病毒杆的埋入发生在多角体发育的某一特定阶段,即多角体的成熟与病毒杆的埋入同时发生(图版 IV 3, 图版 V 10)。如果一旦当多角体日趋成熟,即多角体蛋白已经凝固,即使多角体周围有再多的成熟病毒杆,此刻也无法被埋入到多角体中;其二,套膜病毒与多角体之间有识别信号,即具套膜病毒杆才能埋入到多角体中,而裸露的病毒杆是没有机会被埋入的。

三、核衣壳的释放

48 小时后,一些细胞核中可见到大量病毒杆,有裸露和套膜的两种。裸露的病毒杆急速向细胞膜泳动,并整齐排列在膜的内侧(图版 VI 13, 14),以芽生方式穿过细胞膜并获得套膜,以这种方式释放的病毒杆多为具套膜的单个病毒(图版 IV 8)。96—120 小时后,病变细胞自溶,成熟的套膜病毒、多角体、细胞碎片、甚至病毒基质和大量未能及时装配套膜的病毒杆,随细胞崩解而释放至细胞外液(图版 VI 16)。

根据我们的观察:Ha NPV 的释放过程,至少有两种方式:1. 芽生方式,病毒杆穿过细胞膜,是感染早期的主要释放方式;2. 溶细胞方式,病变细胞破裂崩解,致使大量未能及时套膜的病毒杆也随之溢漏到细胞外液,是感染晚期的主要释放方式之一。关于 NPV 离体复制病毒套膜方式和病毒装配的若干问题,我们将分别于另文作探讨。

参 考 文 献

- [1] 裘卫、朱国凯。1987。应用昆虫杆状病毒防治害虫。生物防治通报,3:39-43。
- [2] 裘卫、朱国凯。1987。苜蓿丫纹夜蛾杆状病毒在四个异源连续细胞系内的传代复制。病毒学报,3:247-251。
- [3] 裘卫、张慧娟、朱国凯。1988。棉铃虫杆状病毒离体复制的研究 I 敏感细胞谱的观察。昆虫学研究集刊,第八集,1-4。上海科学技术出版社。
- [4] 裘卫、朱国凯。1986。昆虫杆状病毒对人和猴四个建株细胞的接种试验。昆虫学研究集刊,第六集,129-134。上海科学技术出版社。
- [5] 裘卫、朱国凯。1987。苜蓿丫纹夜蛾核多角体病毒在离体细胞内的形态发生。昆虫学研究集刊,第七集,27-31。上海科学技术出版社。
- [6] 谢荣栋、杨淑艳。1980。棉铃虫核多角体病毒在血细胞培养物中的感染和复制。昆虫学研究集刊,第一集,129-134。上海科学技术出版社。
- [7] 朱国凯、张慧娟。1984。苜蓿夜蛾核型多角体病毒对六个昆虫建株细胞的感染试验。昆虫学研究集刊,第四集,145-149。上海科学技术出版社。
- [8] 上二医大电镜室。1984。《电镜技术与细胞超微结构》28-33页。上海第二医科大学出版社。
- [9] Chung, K.L., Brown, M., Faulkner, F., 1980. Studies on the Morphogenesis of Polyhedral Inclusion Bodies of a Baculovirus *Autographa californica* NPV. *Journal of General Virology*. **46**: 335-347.
- [10] Hamm, J.J., Styer, E.L. 1985. Comparative Pathology of Isolated of *Spodoptera frugiperda* Nuclear Polyhedrosis Virus in *S. frugiperda* and *S. exigua*. *J. Gen. Virol.* **66**:1249-1261.
- [11] Harrap, K.A., 1972. The Structure of Nuclear Polyhedrosis Viruses The Inclusion Body. *Virology* **50**: 114-123.
- [12] Harrap, K.A., 1972. The Structure of Nuclear Polyhedrosis Viruses The Virus Particle. *Virology* **50**: 124-132.
- [13] Harrap, K.A., 1972. The Structure of Nuclear Polyhedrosis Viruses Virus Assembly *Virology* **50**: 133-139.
- [14] Smith, G.E., Summers, M.D., Fraser, M.J. 1983. Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector. *Molecular and Cellular Biology* **3**: 2156-2165.
- [15] Summer, M.D., Arnott, N.J., 1969. Ultrastructural Studies on Inclusion Formation and Virus Occlusion in Nuclear Polyhedrosis and Granulosis Virus-infected cells of *Trichoplusia ni*. *Journal of Ultrastructure Research* **28**: 462-480.
- [16] Weiss, S.A., et al. 1981. Improved Replication of *Autographa californica* NPV in Roller Bottles, Characterization of the Progeny Virus. *Intervirology* **15**:213-222.

STUDIES ON *HELIOTHIS ARMIGERA* NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS (HA NPV) REPLICATED IN VITRO II THE ULTRA-STRUCTURE OF TN-368 CELL AFTER VIRAL INFECTION

Qiu Wei Ren Hong-lin Zhu Guo-kai

(Shanghai Institute of Entomology, Academia Sinica)

The Ultrastructure of *Trichoplusia ni* TN-368 cell after infection of Ha NPV was observed in electron microscope. Some morphological characteristics were described and a dynamic interpretation of the static images was made. 1. The Ring-band shape virogenic stroma and Hair-clip structure appeared in the nuclei 24—48 hours post infection. The former was the basic material of viral DNA, capsid protein and viral envelopes; The latter was closely related with the nucleocapsid formation, procession, assembly and mature. 2. Instead of normal nuclear structure naked and enveloped viral rods appeared after 48 hours but still there were mitochondria, endoplasmic reticulum, golgiosome and other cell organs in the cytoplasm. 3. Polyhedral structure appeared in the nuclei and viral rods might be occluded after 48 hours. The polyhedron was up to the peak between 96—120 hours post infection. The occluded virus demanded certain development stage of polyhedron and recognized signal between virus and polyhedron. 4. There were at least two ways in nucleocapsid release, by budding from cytoplasm membrane and by cell lysis.

Key words *Heliothis armigera* Nuclear Polyhedrosis Virus TN-368
cell Replication—Ultrastructure