

家蚕卒倒病的病征变化与中肠组织细胞病理的研究^{*}

廖富苹¹ 林志坚¹ 赖海亮¹ 葛慈斌¹ 张永文² 彭许增²

(1 华南农业大学蚕桑系, 广州, 510642; 2 广东省丝绸公司)

摘要 以不同浓度苏芸金杆菌伴孢晶体接种于4龄起蚕, 观察研究家蚕细菌性中毒病的急性和慢性中毒症状及中肠组织细胞的病理变化过程及发病规律。蚕儿食下伴孢晶体 6.5×10^9 个/L后, 呈慢性中毒, 可发现中肠细胞有明显的防御反应, 部分蚕最终可修复受损中肠细胞层并使蚕儿恢复正常。

关键词 苏芸金杆菌; 细菌性中毒; 病征; 组织细胞病理; 细胞防御

中图分类号 S884.41

家蚕卒倒病是摄食了苏芸金杆菌(*Bacillus thuringiensis* Berliner, 以下简称 *B. t.*)产生的伴孢晶体而引起中毒的蚕病, 又称细菌性中毒病。该病流行时来势猛, 发病急, 传染力强。70年代中后期, 曾在广东蚕桑主产区珠江三角洲发生大流行, 造成了巨大的经济损失。该病从石渡氏发现至今已近100年, 国内外关于 *B. t.* 对家蚕和昆虫的致病作用已有不少报道, 但仍存在不少未弄清的问题, 尤其在蚕业生产中该病发生时蚕的外部病征与组织细胞病理变化的关系及发展规律, 国内尚少见详细报道。而该病菌在生产上时有发生; 且 *B. t.* 许多亚种作为生物农药被广泛使用, 稍不注意, 便会给蚕桑生产带来严重危害。因此有必要进行深入研究, 为蚕业生产更好地防治该病以及在生物防治中更好地利用该菌提供依据。

1 材料与方法

供试蚕品种为9°芙×7°湘的4龄起蚕。

1.1 病原及病原液准备

华南农业大学蚕桑系病理研究室保存的苏芸金杆菌苏芸金亚种(*B. t.* subsp. *Thuringiensis*), 把 *B. t.* 接种于牛肉汁蛋白胨琼脂斜面培养基上, 置30℃温箱培养1周, 让其充分产生芽孢及伴孢晶体, 无菌水洗下, 调配成含伴孢晶体 6.5×10^{12} 个/L作为母液, 置4℃冰箱中保存备用。

1.2 试验设区及处理

把预先制备的母液用无菌水以10倍梯度稀释, 含伴孢晶体从 $6.5 \times 10^{11} \sim 6.5 \times 10^8$ 个/L, 每浓度100头蚕, 菌液充分摇匀后涂布于桑叶上, 分别给蚕添食(约每头蚕35μL), 对照区添食无菌水, 随时观察中毒蚕发病病征并同时采样, 固定作切片用。

1.3 光学显微镜材料制备及观察

样本用卡尔纳液固定, 95%酒精保存, 剖取第1~2腹节间的中肠, 按常规进行石蜡包埋、切片, 苏木精—伊红双重染色。Olympus(VANOX)显微镜及PM-10A型摄影装置观察及拍摄。

1.4 透射电子显微镜材料制备及观察

取第1~2腹节的中肠组织,用 φ 为2.5%戊二醛在5℃作前固定,w为1%锇酸后固定,按常规经系列酒精丙酮脱水,812环氧树脂包埋,超薄切片用醋酸铀及柠檬酸铅双重染色,透射电镜为JEM-1010型及日立-600型。

2 试验结果

2.1 急性中毒蚕的病征及中肠组织细胞病变观察

家蚕4龄起蚕接种伴孢晶体 $6.5 \times 10^{10} \sim 6.5 \times 10^{11}$ 个/L,即表现出典型的急性中毒症状。以 6.5×10^{11} 个/L区为例,接种后7~12 min,便停止食桑,前半身抬起,胸部略膨胀呈空头状,经25~30 min,出现痉挛性颤动并伴有吐液;50~60 min后,体躯开始麻痹,个别蚕开始侧卧而死。初死时体色尚无变异,手触尸体有硬块,头部缩入呈钩嘴状,第1~2腹节略伸长;4 h后,死亡率达100%。

光学显微镜观察中肠病变,接种后20 min,可见肠腔尚有大量桑叶,微绒毛开始脱落,圆筒细胞端部膨胀突出于肠腔,甚至脱落,细胞核膨大;杯形细胞也开始拉长(图版2)。纵肌间距平均约为51 μm 。

接种后30 min,大量圆筒细胞向肠腔脱落、崩坏;少数杯形细胞也开始脱落,基底膜上几乎仅残留杯形细胞,且杯腔膨大(图版3);纵肌间距约为48 μm 。

接种后1 h,细胞脱落更严重,有的地方甚至整片细胞脱落(图版4),纵肌间距仅约为45 μm ,而对照蚕约为87 μm ,此时已开始出现死蚕。

图版5是接种后100 min初死蚕的中肠切片,肠腔内仍充满桑叶,大量上皮细胞脱落、崩坏。但围食膜仍存在,而肌肉严重松弛,甚至离散(见/所指)。

图版6为急性中毒死后经12 h的中肠切片,可以在松弛的肌肉层中观察到大量的*B. t.* 营养菌体(/所指),说明*B. t.* 已在死蚕内大量繁殖。

透射电镜观察中肠细胞,接种后仅5 min,便可发现微绒毛开始变形,排列不整齐,圆筒细胞细胞核的异染色质凝聚;细胞质中的线粒体膨大,出现电子极度致密状态(图版14),内瘠几乎消失,有的外膜也消失,粗面内质网膨大。经50 min,微绒毛萎缩;圆筒细胞核的异染色质凝聚,有的还靠向核膜;线粒体成空泡状(图版15),粗面内质网膨大,很难发现基膜内褶。

2.2 慢性中毒蚕的病征及中肠组织细胞病变观察

4龄起蚕接种伴孢晶体 6.5×10^9 个/L,表现出慢性中毒症状,但症状较为复杂。接种后约3 h,蚕儿停止食桑,胸部抬起;约8 h后,部分蚕开始恢复食桑,但较慢;24 h后,蚕儿个体比对照区略小。中毒较严重的开始出现死蚕;48 h后群体开差明显,有部分蚕吐黄色液体,排稀粪,尾部收缩,小肠以下甚至全身空虚,头胸不抬起,呆滞,背管搏动缓慢,匍伏于桑叶面上,手触蚕体感觉柔软,倒卧而死。接种后第4 d死亡率约40%。中毒轻的一部分蚕则经过数天的病理反应(停止食桑等)后,恢复食桑,体色亦渐次恢复正常,但体躯瘦长,发育明显比对照区慢,这部分蚕入眠及上簇均比对照区推迟1~3 d,但最后蚕体和茧质与对照区并无大的差异(另文发表)。

光学显微镜观察其中肠病变;添食1 h后,中肠上皮细胞微绒毛开始脱落,圆筒细胞明显拉长,并开始向肠腔突出,横肌疏松变厚(图版7)。

接种后3 h,可见微绒毛由于脱落而稀疏(图版8, /所指),有的圆筒细胞开始脱出,严重的可见圆筒细胞连片脱落,肌肉层疏松离散,纵肌间距变小。

接种后20 h如图版9,可看到有圆筒细胞继续脱落,但在中肠细胞层中出现有幼稚型细胞

(↗所指), 基底膜上有不少再生细胞(↗所指)。

接种后 44 h 如图版 10, 可见微绒毛渐长出, 但圆筒细胞核仍较大, 杯形细胞杯腔也较膨大, 肠腔侧细胞边缘仍不整齐。

接种后 90 h 仍存活的蚕, 可见中肠细胞除圆筒细胞核较大外, 基本恢复正常, 微绒毛层整齐且比对照厚, 在细胞端部可见二层染色较深的膜状结构(图版 11, ↗所指)。

中毒较重的蚕从接种后第 2 d 开始出现死蚕。图版 13 为接种后 75 h 初死蚕的中肠切片, 可见中肠细胞基本离散, 大量细胞崩坏游离, 肠腔中没有桑叶片, 仅剩消化后的残渣(↗所指), 但组织中未发现大量 *B. t* 营养菌体。

透射电镜观察中肠细胞, 接种后 3 h, 中肠细胞已开始分离, 有的细胞间隙达 $1.2 \mu\text{m}$, 微绒毛收缩变形, 圆筒细胞的核膜模糊, 核区成海绵状(图版 16、17), 有的异染色质高度凝聚后远离核膜。细胞质中内质网扩张, 线粒体溶解。接种后 20 h, 除变化同上述外, 细胞基质中已发现许多空洞, 并有自溶现象, 说明细胞已坏死。

3 讨论

3.1 中毒蚕病征与中肠病变的关系

以不同浓度 *B. t* 晶体接种引起的病征及中肠组织细胞的变化过程及相互关系, 简略如图 1。

蚕在食下伴孢晶体 6.5×10^{11} 个/L 后, 在短时间内即表现典型的急性中毒症状, 中肠组织也发生相应病变, 其中中毒蚕中肠横肌疏松离散, 纵肌间距变小, 推测这是蚕儿食下晶体毒素后中肠很快便停止蠕动的的原因, 也是中毒蚕头胸颤动、蚕死后 1~2 腹节伸长的原因之一。初死蚕围食膜完好, 肠腔充满桑叶, 是由于所食桑叶未及消化或向下移动便中毒死去, 故蚕刚死时外观体色不变, 且手触胸腹部有硬块。

蚕在食下 6.5×10^9 个/L 后,

表现出不同的慢性中毒症状, 中毒较重的蚕由于不能恢复正常的食桑及吸收排泄机能, 故蚕儿胸部及尾部缩小, 小肠以下空虚、拉稀, 以至最后倒卧而死, 肠腔中没有桑叶片, 因此, 其症状及中肠病变表现出与急性中毒有不同的地方。

3.2 蚕儿中肠细胞对 *B. t* 毒素的防御反应

食下伴孢晶体 6.5×10^9 个/L 中毒较轻的蚕, 虽有病征及中肠病变反应, 但能恢复, 推测其由于蚕儿自身免疫系统的协同作用, 中肠再生细胞迅速增生, 其与细胞的脱落达到了动态平衡, 从而使中肠细胞层通过细胞的代偿作用得以逐渐修复, 渐次恢复消化吸收机能, 正常摄食桑叶, 蚕儿逐渐恢复正常。有趣的是, 这些蚕虽然经严重感染及病理反应而推迟 2~3 d 就眠

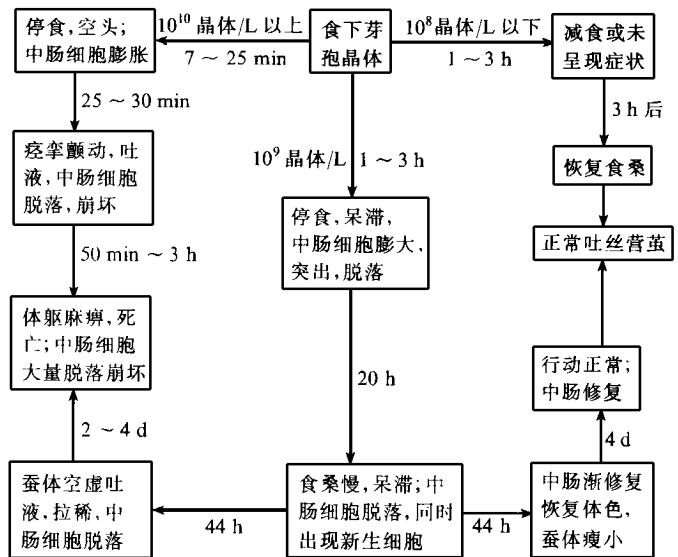


图 1 蚕食下不同剂量晶体后的病征及中肠病变示意图

及成熟,但茧层量及全茧量仍与对照区相仿。从组织学观察及养蚕试验均说明蚕体自身的损伤修复能力是很强的。关于家蚕对 *B. t.* 中毒的中肠细胞防御反应还少见报道,仅见于其它几种昆虫(李顺珍, 1984; 江安世等, 1986; 王程等, 1989; 1991), 而他们都没有提到中肠细胞的损伤与抗损伤的结局。本研究的发现, 为生物防治及害虫抗药性机理的研究提供了参考。

3.3 中肠细胞病理变化

蚕儿食下 *B. t.* 毒素后, 不管是急性中毒还是慢性中毒, 均会引起一系列的中肠细胞病理变化, 而变化最快的是线粒体, 急性中毒蚕感染 *B. t.* 毒素后仅 5 ~ 50 min, 线粒体便严重变性, 慢性中毒后 3 h, 线粒体便溶解。由于线粒体受损伤, 其氧化磷酸化后合成 ATP 功能受损, 因 ATP 能量生成的减少而影响细胞 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATP 酶(钠泵)运转功能, 从而造成钠在细胞内滞留, Ca^{2+} 和水进入细胞内, 致使细胞肿胀; 其他细胞器也相继受到损坏而丧失细胞的功能。圆筒细胞受害先于杯形细胞并比杯形细胞严重, 推测这是由于两种细胞的生理功能差异所致。

致谢 承黄自然教授审阅并指正, 陈革副教授对试验提供宝贵意见; 谭佩婵、张尾嫫同志协助部分试验工作; 华南农业大学、中山医科大学及华南植物研究所电镜室给予大力协助, 在此一并致谢!

参 考 文 献

- 王 程. 1989. 苏芸金杆菌导致昆虫细胞病变及作用方式的研究进展. 昆虫知识, 26(6): 367 ~ 369
- 王 程, 沙槎云. 1991. 苏芸金杆菌感染粘虫中肠组织学病变的研究. 昆虫学报, 34(1): 50 ~ 52
- 华南农学院蚕桑系蚕病研究组. 1978. 家蚕急性软化病发生的规律及预防措施. 广东蚕丝通讯, (1): 59 ~ 63
- 江安世, 严奉琰, 彭武康. 1986. 外来缀蛾幼虫感染苏力菌中肠细胞反应及肠液酸碱度变化并探讨苏力菌对各类型寄主之致病机制. 植保会刊, (28): 179 ~ 189
- 李顺珍. 1984. *B. t. i* 感染致倦库蚊幼虫的细胞病理研究. 见: 蒲蛰龙主编. 苏云金杆菌以色列变种防治蚊幼虫的研究. 广州: 中山大学出版社, 52 ~ 72
- Yasuhisa Endo, Junko Nishiitsutsuji-Uwo. 1980. Mode of action of bacillus thuringiensis δ -Endotoxin: Histopathological changes in the silkworm midgut. J Invertebrate Pathology, 36: 90 ~ 103
- Jean P, Paul G F. 1983. Bacillus thuringiensis crystal toxin: Ultrastructural studies of its effect on silkworm midgut cells. J Invertebrate Pathology, 41: 86 ~ 98

Studies on Symptoms and Cytopathology of Midgut Tissues of Silkworm Caused by Bacterial Toxicosis

Liao Fupin¹ Lin Zijian¹ Lai Hailiang¹ Ge Cbin¹ Zhang Yongwen² Peng Xuzeng²
(1 Dept. of Sericulture, South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642; 2 Guangdong Silk Corporation)

Abstract With various dosages of crystalline parasporal bodies of *Bacillus thuringiensis* fed to the newly moulted silkworm larvae of 4th instar, the chronic and acute symptoms of bacterial toxicosis as well as the course of cytopathological change of midgut and its pathogenesis were observed and studied. After feeding with 6.5×10^9 crystalline bodies/L, chronic symptoms appeared. Significant defense responses were found in the midgut cells. Injured cell layers of some larvae could finally recover and the larvae became normal.

Key words *Bacillus thuringiensis*; bacterial toxicosis; symptom; histologic; cell defense