

# 黑条灰灯蛾分离的一种微孢子虫生物学特性研究

郑祥明<sup>1</sup>, 杨琼<sup>1</sup>, 黄炳辉<sup>1</sup>, 卢铿明<sup>2</sup>, 余爱群<sup>3</sup>

(1 广东省农科院蚕业研究所, 广东广州 510640; 2 华南农业大学蚕桑系, 广东广州 510642; 3 广东省丝绸集团公司, 广东广州 510180)

**摘要:**从广东省曲江县蚕区捕捉的黑条灰灯蛾(*Cretonotus gungis* L.)成虫分离到一种微孢子虫。孢子大小为 $(3.03 \pm 0.17) \mu\text{m} \times (1.90 \pm 0.07) \mu\text{m}$ ;孢子的血清学类型、超微结构与传统的家蚕微孢子虫(*Nosema bombycis*, 简称 N. b.)有差异;黑条灰灯蛾微孢子虫的发育周期符合 *Nosema* 属的特征;对家蚕有中等程度的感染能力,经卵传染频率较低。

**关键词:**微孢子虫;黑条灰灯蛾;家蚕

**中图分类号:**S 884.21

**文献标识码:**A

昆虫微孢子虫病,是由微孢子原虫寄生昆虫体而引起的传染性疾病,种类繁多。自然界昆虫之间存在着复杂的微孢子虫交叉感染网,给经济昆虫微孢子虫病害的防疫带来了困难。日本对 102 种昆虫检索,在 65 种昆虫中检出微孢子虫,其中 12 种对家蚕有病原性<sup>[1]</sup>。作者近年也对 389 种昆虫检索,在 44 种昆虫中检出微孢子虫,已知其中 14 种对家蚕有病原性。同时,由于微孢子虫类为专性寄生,又具胚种传染的能力,作为微生物杀虫剂应用于农林害虫的生物防治也受到人们的重视<sup>[2,3]</sup>。

对各种昆虫微孢子虫生物学特性的研究,阐明它们的分类学地位及各种昆虫之间交叉感染的情况,将有助于查明养蚕生产中不断出现的新微孢子虫的来源和为开拓利用微孢子虫防治害虫的研究新领域提供理论依据。现将从黑条灰灯蛾(*Cretonotus gungis* L.)成虫分离的一种微孢子虫的研究结果报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

从广东曲江蚕区捕捉的黑条灰灯蛾成虫分离的微孢子虫(暂称 Crg-M),经分离、提纯的孢子液于 4℃保存备用。

家蚕继代 Crg-M 孢子方法:将 Crg-M 孢子于家蚕 2 龄起蚕添食接种,隔离常规饲育,蛾期镜检收集。家蚕微孢子虫(*Nosema bombycis*, 简称 N.b.)为广东省农业科学院蚕业研究所蚕病室继代保存的孢子。

### 1.2 方法

(1)孢子形态观察。将提纯的原代孢子置 600 倍光学显微镜下观察形态,以测微尺测量孢子大小。

(2)孢子血清学类型测定。采用致敏胶乳玻片凝集法,用以兔抗 N.b. IgG 致敏  $0.81 \mu\text{m}$  的胶乳粒子,抗原为提纯的 Crg-M 孢子,测试时各取 1 滴滴于干净载玻片上,搅匀后盖上盖玻片,置 27℃ 10 min,显微镜下观察孢子与胶乳粒子粘附的情况。

(3)孢子超微结构观察。将纯化的 Crg-M 孢子包埋于琼脂糖中,戊二醛-锇酸双固定,按常规方法超薄切片,以醋酸铀-柠檬酸铅双重电子染色后,于 EM-400 型透射电子显微镜下观察。

(4)微孢子虫生活史的观察。2 龄起蚕添食经家蚕继代的 Crg-M 孢子  $10^7$  个/mL,6 h 开始,取后部中肠涂片,以后每天涂片 1 次,至新孢子形成。涂片用甲醇固定,吉姆萨染色,600 倍光学显微镜下观察。

(5)对家蚕病原性测定。食下感染:Crg-M 为供试材料,N.b.孢子为对照, $10^3 \sim 10^7$  个/mL 10 倍系列孢子稀释液分别添食 3 龄起蚕 12 h,常规饲养,熟蚕前逐条蚕镜检孢子,调查感染头数,按 Reed-Muench 法计算  $IC_{50}$ 。

胚种传染:3 龄起蚕添食 Crg-M 孢子  $10^7$  个/mL,常规饲育,单蛾制种,将镜检有多量孢子的母蛾所产的卵进行试验,每卵圈分 2 份,1 份在蚁蚕、1 份在 3 龄蚕期调查,将待检样品研磨后过滤,滤液离心后镜检。观察有无孢子存在,判别胚种传染性。

收稿日期:1999-08-27

作者简介:郑祥明(1952~),女,研究员,硕士

基金项目:国家重点科技项目(攻关)计划子专题资助项目(96-616-02-03-01);广东省农科院院长基金资助项目

## 2 结果与分析

### 2.1 孢子形态大小

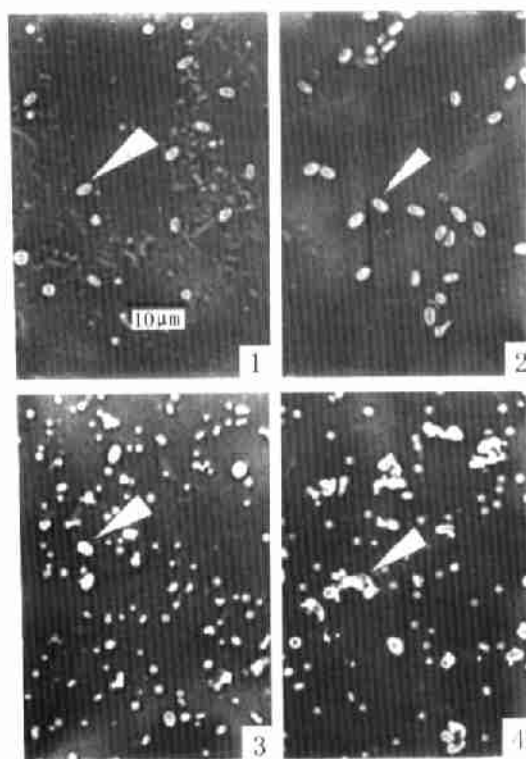
在光学显微镜下,Crg-M孢子比N.b.孢子稍小(表1),但形态与N.b.相似,都为卵圆形,群体大小开差不大,折光性强(图1)。经家蚕继代后的Crg-M孢子形态较稳定。

表1 Crg-M孢子与N.b.孢子形态大小比较<sup>1)</sup>

Tab. 1 Comparison of spore shape and size of Crg-M and N. b.

| 微孢子虫  | 形态  | $l_{\text{长轴}}/\mu\text{m}$ | $l_{\text{短轴}}/\mu\text{m}$ | 长短轴之比 | $V/\mu\text{m}^3$ |
|-------|-----|-----------------------------|-----------------------------|-------|-------------------|
| Crg-M | 卵圆形 | $3.03 \pm 0.17$             | $1.90 \pm 0.07$             | 1.6   | 5.7               |
| N.b   | 卵圆形 | $3.45 \pm 0.15$             | $2.25 \pm 0.15$             | 1.5   | 9.15              |

$$1) V_{\text{孢子}} = \pi/6 \cdot r_{\text{长轴}} \cdot r_{\text{短轴}}^2$$



1. 黑条灰灯蛾微孢子虫孢子; 2. 家蚕微孢子虫孢子;
3. 兔抗 N.b. 孢子致敏胶乳与 Crg-M 孢子反应(-);
4. 兔抗 N.b. 孢子致敏胶乳与 N.b. 孢子反应(+)
1. Crg-M spores; 2. N.b. spores;
3. Serological reaction between latex sensitized with anti-N. b. habit serum and Crg-M spores(-);
4. Serological reaction between latex sensitized with anti-N. b. habit serum and N. b. spores(+)

图1 二种微孢子虫外部形态及血清学关系

Fig. 1 Spore shape and serological reaction of Crg-M and N. b.

### 2.2 孢子血清学类型测定

光学显微镜下,Crg-M孢子与抗N.b. IgG致敏胶乳粒子分开没有凝集现象,与阳性对照区N.b.

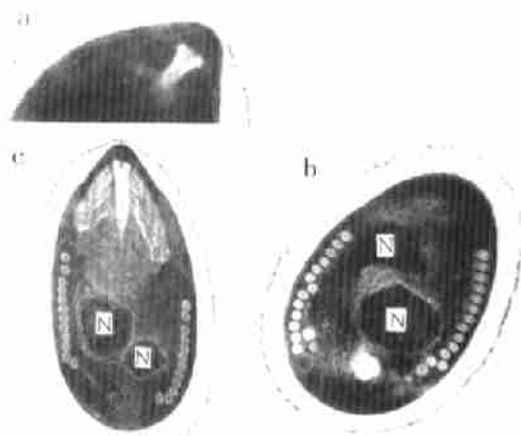
孢子上吸满胶乳粒子的现象有明显差异(图1-3)。说明Crg-M孢子与N.b.孢子无共同抗原性。

### 2.3 孢子的超微结构

Crg-M孢子的壁较粗糙;极膜层着色均匀,层次不明显;极帽呈漏斗状;呈双核;极丝14~15圈,极丝与孢子中轴倾角为59°左右;极泡呈腰形,内部物质着色不均匀(图2)。

### 2.4 微孢子虫的生活史

2龄起蚕食下Crg-M孢子后,6 h可在中肠细胞质中见到刚侵入的芽体,芽体被Giemsa染色后,可见染成红色的双核,而细胞质则不上色(图3-1);24~48 h在细胞质中观察到双核裂殖体,裂殖体多为椭圆形,细胞核较小,但着色分明,轮廓清楚(图3-2);72 h以后裂殖体大量分裂,形成大量的双核裂殖体或由多个双核裂殖体组成的细胞质尚未分开的连核裂殖体,后期裂殖体变为纺锤形,在细胞质出现Giemsa染不上色的高折屈率小球,开始形成孢子芽母细胞(图3-3);孢子芽母细胞按二分裂形成2个孢子芽,在接种后72~96 h出现的孢子芽母细胞形成



- a. 黑条灰灯蛾微孢子虫孢子极帽(23 000×); b. 黑条灰灯蛾微孢子虫孢子(18 000×); c. N.b. 孢子(14 000×)
- a. Polar cap of Crg-M spore(23 000×); b. Crg-M spore(18 000×); c. N.b. spore(14 000×)

图2 黑条灰灯蛾微孢子虫孢子(Crg-M)与家蚕微孢子虫孢子N.b.的超微结构

Fig. 2 Ultrastructure of Crg-M and N. b.

短极丝孢子,96 h以后可观察到内部被Giemsa染成深蓝色的短极丝孢子(图3-4)及短极丝孢子发芽形成的二次感染体对相邻细胞的侵入(图3-5);120 h见裂殖体再次大量分裂(图3-6);144 h以后孢子芽母细胞大量形成,1个孢子芽母细胞分裂为2个孢子芽(图3-7);192 h以后,在细胞质中可观察到长极丝孢子形成(图3-8)。从芽体开始侵入组织到新孢子的

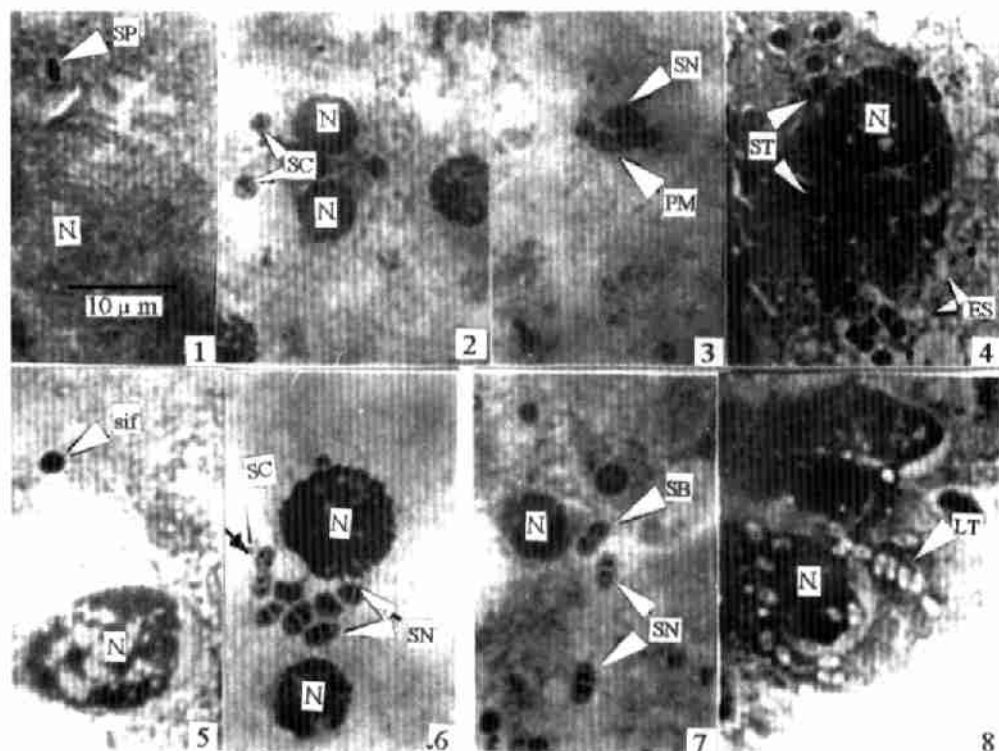
形成,需要8~9 d.

## 2.5 对家蚕病原性测定

食下感染:接种后13 d逐条蚕镜检,调查发病蚕数,根据 Reed-Muench 法计算出3龄起蚕接种经家蚕继代的 Crg-M 对蚕的感染中量  $IC_{50}$  为  $7.40 \times 10^5$  个孢子,而 N.b. 对蚕的感染中量  $IC_{50}$  为  $7.94 \times 10^3$

个孢子,试验结果证明:Crg-M 对家蚕的食下感染性比 N.b. 弱100倍左右.

胚种传染:将严重感染 Crg-M 的家蚕母蛾所产的12个卵圈各分为2份.常规处理,孵化后在蚁蚕期和3龄期调查.12个卵圈中有5个检出孢子,检出率为41%,每视野孢子检出密度较低.



SP:芽体;SC:裂殖体;SN:孢子芽母细胞;SB:孢子芽;PM:连核裂殖体;LT:长极丝孢子;ST:短极丝孢子;ES:发芽后的孢子壳;SIF:二次感染体;N:宿主细胞核

SP: Sporoplasm; SC: Schizont; SN: Sporont; SB: Sporoblast; PM: Plasmodium; LT: Long polar tube spore; ST: Short polar tube spore; ES: Empty spore; SIF: Second infection form; N: Nucleus.

1. 6 h 侵入细胞质的双核芽体;2. 24~48 h 双核裂殖体;3. 72~96 h 连体裂殖体和孢子芽母细胞;4. 96 h 早期短极丝孢子和发芽后短极丝孢子空壳;5. 96~120 h 二次感染体侵入相邻组织细胞质;6. 120~144 h 裂殖体分裂及孢子芽母细胞形成;7. 144~168 h 孢子芽母细胞二分裂形成2个孢子芽;8. 196 h 长极丝孢子形成;

1. Binucleate sporoplasm invaded host cytoplasm, 6 h p.i.; 2. Binucleate schizonts, 24~48 h p.i.; 3. Schizont Plasmodia and sporonts, 72~96 h p.i.; 4. Early stage of ST and ES, 96 h p.i.; 5. Sif invaded close organ cytoplasm, 96~120 h p.i.; 6. Schizonts were dividing and sporonts formed, 120~144 h p.i.; 7. Sporonts developed into 2 sporoblasts by binary division, 144~168 h p.i.; 8. LT formed, 196 h p.i.

图3 黑条灰灯蛾微孢子虫在家蚕中肠组织的发育周期

Fig. 3 Life cycle of Crg-M in midgut tissue cells of silkworm, *Bombyx mori*

## 3 讨论

3.1 从黑条灰灯蛾分离到一种微孢子虫 Crg-M. 孢子外部形态、大小、血清学类型都与传统家蚕微孢子虫 N.b. 有明显差异.

3.2 Crg-M 内部结构与 N.b. 孢子有差异:极帽 Crg-M 为漏斗状,N.b. 为马蹄状;极膜 Crg-M 着色均匀但层次不清,而 N.b. 是由若干层片状的膜围成一封闭锥体,膜的层次分明;极丝 Crg-M 为14~15圈,

N.b. 为12~13圈,比 N.b. 多2圈.

3.3 Crg-M 生活史中,各发育阶段均为双核,由一个孢子芽母细胞形成2个孢子芽,有短极丝孢子和二次感染体形成,具 *Nosema* 属的特征<sup>[4]</sup>,应分类于 *Nosema* 属.

3.4 Crg-M 在家蚕体内完成一世代(从孢子发芽到新孢子形成)所需的时间比 N.b. 长,有连核现象.同时,它的外部形态、血清学关系、内部结构均与 N.b. 有差异,故认为从黑条灰灯蛾分离的微孢子虫 Crg

-M与家蚕N.b.是同属 *Nosema* 属的不同种。

3.5 黑条灰灯蛾分离的微孢子虫 Crg-M 与家蚕 N.b. 种类不同,但对家蚕同样具食下传染和胚种传染的能力,可见昆虫之间存在着复杂的微孢子虫交叉感染网。

3.6 对野外昆虫分离的微孢子虫进行形态特征、血清学关系、孢子超微结构、微孢子虫生活史及对家蚕感染性的研究,其结果可为微孢子虫的分类,探讨昆虫间各种微孢子虫交叉感染的机理提供依据。从而,对经济昆虫微孢子虫病害的防疫及微孢子虫类在农林害虫生物防治的应用有重要意义。

致谢:参加本研究的还有广东省农科院蚕业研究所方定坚、廖森泰、华南农业大学蚕桑系徐兴耀、广东省丝绸集团公司黄星光。

#### 参考文献:

- [1] 广濑安春. 昆虫寄生の微孢子虫类について[J]. 蚕丝研究, 1979, (11): 118~123.
- [2] 渡部仁. 微生物で害虫を防ぎ[M]. 日本东京: 日本裳华房, 1988, 122~125.
- [3] 赖勇流, 谢伟东. 昆虫原生动物的[C]. 蒲蛰龙. 昆虫病理学[M]. 广州: 广东科技出版社, 1992. 407~464.
- [4] 岩野秀俊. 天敌微生物的研究手法[J]. 植物防疫(特别增刊号), 1993, (2): 81~90.

## Studies on the Biology Features of a Microsporidian Isolated from *Greatonotus gungis* L.

ZHENG Xiang-ming<sup>1</sup>, YANG Qiong<sup>1</sup>, HUANG Bing-hui<sup>1</sup>, LU Keng-ming<sup>2</sup> YU Ai-qun<sup>3</sup>

(1 Sericultural Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China;

2 Dept. of Sericultural, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China; 3 Guangdong Silk Corporation, Guangzhou 510180, China)

**Abstract:** A microsporidian was isolated from *Greatonotus gungis* L. which caught in the silkworm reared-region in Qujian county, Guangdong Province. The size of the spore was  $(3.03 \pm 0.17) \mu\text{m} \times (1.90 \pm 0.07) \mu\text{m}$ . The serology type and ultrastructure of the spore were different from that of *Nosema bombycis*. The development cycle in the silkworm accorded with the feature of Genus *Nosema*. The microsporidian had a medium oral infectivity and low transovarian transmission to silkworm, *Bombyx mori*.

**Key words:** microsporidian; *Greatonotus gungis* L.; silkworm (*Bombyx mori*)

【责任编辑 张 砾】