

蓝叶甲微孢子虫的特征及其对家蚕的 病原性研究

廖森泰 方定坚 郑祥明

(广东省农业科学院蚕业研究所)

农朝志

(广东省丝绸公司蚕桑生产部)

卢铿明

(华南农业大学蚕桑系)

摘要 从四川省阆中市蚕区捕捉的蓝叶甲 (*Phyllotreta armata* Baly) 中分离到一种大型微孢子虫, 孢子大小为 $4.75 \pm 0.40 \mu\text{m} \times 2.85 \pm 0.25 \mu\text{m}$, 孢子的超微结构及在家蚕体内的发育周期符合 *Nosema* 属的特征, 对家蚕有强的食下传染, 感染家蚕后的经卵传染频率很低。

关键词 微孢子虫; 蓝叶甲 (*Phyllotreta armata* Baly); 家蚕

家蚕微粒子病是由家蚕微孢子虫 (*Nosema bombycis* 简称 N. b) 寄生所引起。近年国内外报导, 在蚕体中检出一些在形态大小、生物学特性等方面与 N. b 不同的异型微孢子虫^[1,2], 并认为与其他昆虫微孢子虫的交叉感染有关。日本广濑对 102 种昆虫进行检查, 在 65 种昆虫中检出了微孢子虫, 有 12 种昆虫的微孢子虫可以感染家蚕, 其中 2 种昆虫的 3 种微孢子虫可以胚种传染^[2]。国内亦有报导龙眼裳卷蛾 (*Ceraca stipitata* Walker)^[3]、桑尺蠖 (*Hemerophila atrilixata* Butler)^[4,5]、二点螟 (*Chilo infuscatellus* Senllen)^[6]、蜀柏毒蛾 (*Paracnema furva* Leech)^[7,8] 等微孢子虫与家蚕的交叉感染关系。

作者于 1991 年 5 月在四川省阆中市蚕区捕捉到十字花科蓝叶甲 (*Phyllotreta armata* Baly), 从中分离到一种大型的微孢子虫, 暂称蓝叶甲微孢子虫 (*Nosema* sp. 简称 N. P), 对其形态大小、超微结构、在家蚕体内的发育周期及对家蚕的病原性进行了研究, 现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

从四川省阆中市蚕区捕捉的蓝叶甲中分离的 N. P 孢子为原代孢子, 经口接种家蚕繁殖的孢子为 N. P 继代孢子。供试家蚕品种为新九。

1.2 方法

1.2.1 孢子形态观察 将原代 N. P 孢子和经家蚕继代的孢子提纯, 置光学显微镜下观察形态, 以测微尺测量孢子大小。

1.2.2 孢子超微结构观察 将提纯的孢子离心, 取沉淀的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

· “八五”国家科技攻关计划 85-606-05-03 的一部分研究内容

1992-03-16 收稿

透射电子显微镜下观察。

1.2.3 孢子在蚕体内的发育周期观察 对4龄起蚕以 10^6 孢子/ml经口接种,接种后第1日每隔12h、第2日起每隔24h取接种蚕中肠后部涂片,甲醇固定后,以Giemsa液染色,置油镜下观察。

1.2.4 对家蚕的病原性调查 以 10^6 孢子/ml的N.P原代孢子对4龄起蚕经口接种,常规饲养,镜检调查幼虫期、蛾期的感染率以确定对家蚕能否食下传染。将检出孢子的家蚕母蛾所产的卵进行即时浸酸处理,抽取部分化鸟卵及1龄、2龄、3龄迟眠蚕和4龄起蚕全部进行显微镜检查,调查有无胚种传染。

2 结果

2.1 孢子的形态和大小

N.P孢子和N.b孢子的形态、大小有较明显的差异(表1、图1)N.P孢子呈椭圆形或长椭圆形,比N.b大,折光性强,原代孢子与经家蚕继代的孢子的形态,大小及折光性均变化不大,但原代孢子大小开差较大,继代孢子比较均一。

表1 N.P与N.b的孢子形态大小比较*

微孢子虫别	形态	长轴 μm	短轴 μm	长短轴 之比	体积 μm^3	
N.P	原代	椭圆、长椭圆	4.75 ± 0.40	2.85 ± 0.25	1.67	20.26
	继代	椭圆、长椭圆	4.75 ± 0.25	2.85 ± 0.22	1.67	20.26
N.b	椭圆	3.45 ± 0.15	2.25 ± 0.15	1.53	9.15	

* 孢子测定40个; 孢子体积= $4/3\pi \cdot$ 长轴半径 \cdot 短轴半径 2

2.2 孢子的超微结构

电镜观察结果,N.P孢子壁分3层,厚约 $0.33\mu\text{m}$,孢子具双核,极膜层为片状结构,极丝绕核排列成14~16圈,极丝最小倾斜角为 28° (图2)。

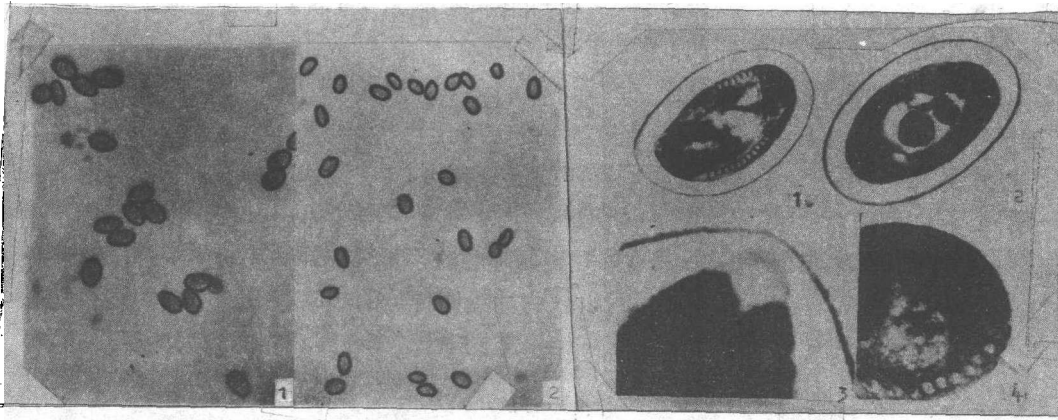


图1 蓝叶甲微孢子虫(N.P)和家蚕微孢子虫(N.b)的孢子
1 N.P孢子 $\times 1228$
2 N.b孢子 $\times 1228$

图2 蓝叶甲微孢子虫孢子的超微结构
1. 孢子极丝为16圈 $\times 13500$
2. 孢子具双核 $\times 13500$
3. 极帽和极质体 $\times 48375$
4. 孢子后部 $\times 37500$

2.3 N. P 在家蚕体内的发育周期

4龄起蚕接种原代 N. P 孢子, 经定时连续涂片 Giemsa 液染色, 可观察到 N. P 孢子进入蚕体后的发育周期。孢子进入蚕体, 首先释放出双核的芽体, 不久双核融合成单核的裂殖体, 圆形或椭圆形, 大小约 $4.5\mu\text{m}$, 还可看到裂殖生殖的双核和四核裂殖体, 大小为 $3.8\mu\text{m}$, 随着时间的延长, 裂殖体形成孢子芽母细胞, 一个孢子芽母细胞再分裂成两个孢子芽细胞, 然后经梨形孢子发育成熟孢子(图 3)。在 25°C 条件下, N. P 在家蚕体内从孢子到子代孢子的发育经过时间需要 5~7 天。

2.4 N. P 对家蚕的病原性

2.4.1 食下传染 从四川省阆中市蚕区捕捉的蓝叶甲共 50 头, 镜检到 45 头有微孢子虫, 患病率达 90%。将提纯孢子以 10^6 孢子/ml 给 4 龄起蚕经口接种, 蚕期未见明显病征, 但死笼茧感染率为 59.4%; 蛾期调查, 感染率高达 95%。

2.4.2 经卵传染 共取 11 个有孢子感染的重病母蛾所产卵圈, 即时浸酸处理后催青、孵化, 分区饲养子代, 在化乌卵和 1、2、3 龄迟眠蚕均未镜检到孢子, 4 龄起蚕时, 各蛾区以 10 头蚕为 1 集团, 研磨、过滤、离心后镜检, 在总共 127 个集团中只发现 1 个集团有极少量的 N. P 孢子。

3 讨论

从蓝叶甲分离的微孢子虫 N. P 在家蚕体内的发育周期经芽体、裂殖体、孢子芽母细胞、孢子芽细胞而发育成孢子, 其中孢子形成期由 1 个孢子芽母细胞分裂为 2 个孢子芽细胞并发育成 2 个孢子, 孢子具双核, 这些特征与 *Nosema* 属的特征相符。然而, N. P 孢子在形态大小上与 N. b 孢子差异较大, 其超微结构也明显不同, N. P 孢子的孢子壁较厚, 极丝圈数多, 极丝最小倾斜角为 28° , 小于 N. b 的 49° ^[9]。因此, 很可能是一种属于 *Nosema* 属而与 N. b 不同种的微孢子虫。

关于异种昆虫微孢子虫感染家蚕后有无经卵传染是一个十分重要的问题。本试验以 N. P 经口感染家蚕后的 11 个重病母蛾所产卵圈进行实验, 子代化乌卵及 1、2、3 龄迟眠蚕均未检出孢子, 但在 4 龄起蚕分区集团研磨镜检时, 在 127 个集团中只在 1 个集团中镜检到视野孢子密度极低的 N. P 孢子, 由于采用集团研磨法, 无法统计病率, 但从孢子密度极低可以判断子代患病个体数少, 因此, 可以认为其经卵传染的频率很低, 类似的结果文献亦有报导^[10]。问题是 N. P 因食下传染在家蚕体内重复继代, 其经卵传染的频率能否提高, 值得深入研究。

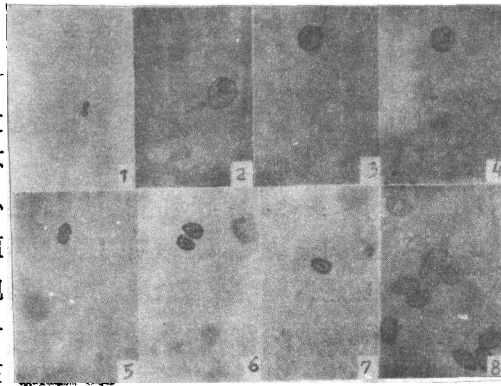


图 3 蓝叶甲微孢子虫在家蚕体内的发育周期

1. 双核的芽体 $\times 1228$

2. 3. 4 单核、双核、四核的裂殖体 $\times 1228$

5. 6 孢子芽母细胞分裂成 2 个孢子芽细胞

$\times 1228$ 7 双核梨形孢子

· 致谢 本文承华南农业大学黄自然教授审阅谨此致谢

参 考 文 献

- 1 方定坚等·家蚕新微孢子虫 MG1 MG2 的研究·广东农业科学, 1991, 2: 35~38
- 2 四川省蚕业制种公司·家蚕微孢子虫病资料选编·成都: 成都科技大学出版社, 1991, 52~53, 62~63
- 3 唐聘芳等·龙眼裳卷蛾微孢子虫对家蚕致病性研究·四川蚕业, 1985, 4: 12~15
- 4 李达山·关于家蚕新病原微孢子虫的研究·江苏蚕业, 1989, 4: 4~7
- 5 梅玲玲等·家蚕微孢子虫与桑尺蠖微孢子虫研究·蚕业科学, 1989, 15 (3): 135~138
- 6 同锦曾等·中国家蚕微孢子虫及其近缘种的考察·中国农业科学, 1989 22 (2): 15~19
- 7 王宏·蜀柏毒蛾微孢子虫对家蚕有致病性·南充蚕业, 1989, 4: 49
- 8 张培基·关于蜀柏毛毒蛾微孢子虫感染家蚕的调查与试验情况初报·绵州蚕业, 1990, 1: 19~21
- 9 Sato R. et al. Internal ultrastructure of microsporidians isolated from the silkworm *Bombyx mori*. J Invertebr Pathol, 1982, 40: 260~265
- 10 Han M. et al. Transovarial transmission of two microsporidia in the silkworm *Bombyx mori* and disease occurrence in the progeny population. J Invertebr Pathol, 1988, 51: 41~45

STUDIES ON THE CHARACTER OF A MICROSPORIDIAN PARASITE FROM *Phyllobrotica armte*
Baly AND PATHOGENICITY TO THE SILKWORM, *Bombyx mori*.

Liao sentia Fang DingJian Zheng Xiangming

(Sericultural Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural sciences)

Nong Chaozhi

(Sericultural Production Division, Guangdong Silk Corporation)

Lu Kengming

(Sericultural Department, South China Agricultural University)

Abstract A mulberry leaf beetle (*Phyllobrotica armte* Baly) was caught in the silkworm rearing region of Langzhong city, Sichuan Province, China. A big species of a microsporidian was isolated from *Phyllobrotica armte* Baly. The size of the spore was $4.75 \pm 0.40 \mu\text{m} \times 2.85 \pm 0.25 \mu\text{m}$. The ultrastructure of the spore and its development cycle in the silkworm body was conformable to the feature of Genus *Nosema*. It has a strong oral infectivity to the silkworm, *Bombyx mori*. After the infection with the silkworm the transovarial transmission was very feeble.

Key words Microsporidian; *Phyllobrotica armte* Baly; *Bombyx mori*