

文章编号: 1001-411X(2002)02-0037-03

东方粉蝶微孢子虫 M-Pc2 的研究

杨琼¹, 徐兴耀¹, 卢铿明¹, 郑祥明², 方定坚²

(1 华南农业大学艺术设计学院, 广东 广州 510642; 2 广东省农业科学院蚕业研究所, 广东 广州 510610)

摘要: 从东方粉蝶成虫体中分离到一种卵圆形微孢子虫 M-Pc2, M-Pc2 孢子大小为 $(3.38 \pm 0.35) \mu\text{m} \times (2.43 \pm 0.17) \mu\text{m}$, 孢子双核结构, 在家蚕体内可见到典型的 *Nosema* 型发育过程, 认为 M-Pc2 应归入 *Nosema* 属. 这种微孢子虫对家蚕具中度食下感染和弱胚种传染能力.

关键词: 微孢子虫; 东方粉蝶; 家蚕; 病原性; 分类
中图分类号: Q959.115.92 **文献标识码:** A

东方粉蝶是一种常见的十字花科蔬菜害虫, 其成虫活动范围广, 在桑园及养蚕环境中经常可见. 在 1997、1998 年调查发现, 从广东蚕区捕捉到的东方粉蝶成虫自然感染率分别高达 42.6% 和 32.0%, 且孢子形态多样, 经筛选得到 2 株形态差异显著的微孢子虫 M-Pc1 和 M-Pc2. M-Pc2 的形态与家蚕微孢子病传统病原 N. b. 相似, 常规显微镜检查无法区分两者. 为了解 M-Pc2 是否感染家蚕, 与 N. b. 在分类有何异同之处, 对 M-Pc2 进行了研究.

1 材料与方法

1.1 材料

东方粉蝶 (*Pieris canidia* S.) 微孢子虫 M-Pc2 是从东方粉蝶成虫体中分离得到, 用差速离心法提纯, 4℃ 保存备用. 家蚕微孢子原虫 (*Nosema bombycis*, 简称 N. b.) 为广东省农业科学院蚕业研究所蚕病研究室继代保存株. 抗 N. b. IgG 致敏胶乳为日本九州大学河原勇教授馈赠.

1.2 方法

(1) M-Pc2 孢子形态观察及大小测定: 用 600 倍光学显微镜观察孢子形态, 用测微尺测量 20 个原代及经家蚕继代的 F₁、F₂ 代孢子大小, 并按照体积公式 $V = \pi/6 \times \text{长轴} \times \text{短轴}^2$ 计算孢子体积.

(2) M-Pc2 生活史的研究: 将接种 M-Pc2 病原的家蚕宿主在 25℃ 温度下饲养, 取寄生组织涂片, 甲醇固定, Giemsa 染色, 油镜下观察, 显微摄影拍摄各发育阶段.

(3) M-Pc2 与 N. b. 血清学关系测定: 采用致敏胶

乳玻片凝集法, 将 M-Pc2 和 N. b. 分别与抗 N. b. IgG 致敏胶乳进行血清学反应, 显微镜观察反应情况.

(4) 对家蚕病原性研究: 包括食下感染和胚种传染两方面. 食下感染: 以 N. b. 为对照, 将 M-Pc2 孢子液配制成 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^7$ 个/mL 的 10 倍孢子系列稀释液, 涂抹桑叶, 添食 3 龄起蚕, 每个处理区 50 头蚕, 连续经口接种 12 h 后, 改用无病原桑叶饲养, 熟蚕前逐条镜检, 调查家蚕感染头数, 按 Reed-Muench 法^[1] 计算 M-Pc2 对家蚕 3 龄起蚕的感染中量 (IC₅₀). 取染病幼虫中肠、丝腺、马氏管等组织以无菌水冲洗数次, 分别涂片镜检有无孢子, 调查病原在蚕体中的寄生部位. 胚种传染: 取镜检染病母蛾所产卵圈进行调查, 每卵圈平均分成 2 份, 分别于蚁蚕和 3 龄蚕期调查感染情况, 判断该微孢子虫对家蚕是否具胚种传染能力. 将镜检时每视野孢子量超过 100 个孢子的母蛾所产的卵孵出的蚁蚕及死卵逐条镜检, 根据 Han 等^[2] 方法计算该微孢子虫对家蚕的胚种传染率.

(5) M-Pc2 孢子超微结构观察: 将纯化的孢子包埋于琼脂糖中, 戊二醛-锇酸-高锰酸钾三固定, 按常规方法超薄切片, 以醋酸铀-柠檬酸铅双重电子染色后, 于日立 EM-400 型透射电子显微镜下观察, 显微摄影.

2 结果与分析

2.1 M-Pc2 孢子的形态及大小

由表 1 可知, M-Pc2 孢子经家蚕继代后, 形态大小与原代没有明显变化, 仅短径比原代稍变窄. M-Pc2 孢子与 N. b. 孢子形态大小差异不明显 (图 1).

收稿日期: 2001-06-22

作者简介: 杨琼(1970-), 女, 助理研究员, 硕士, 现在广东省农业科学院蚕业研究所工作.

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

11)资助项目

©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

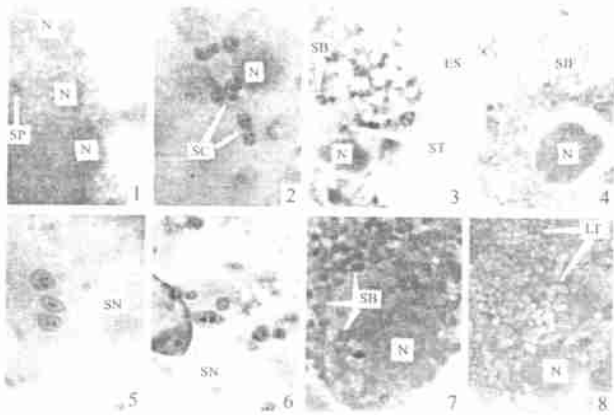
表1 M-Pc2 孢子与 N. b. 孢子的形态及大小比较($n=20$)

Tab. 1 Comparison of spore shape and size of M-Pc2 and N. b.

微孢子虫 spores	繁殖代数 generation	形态 shape	l 长轴 long axis/ μm	l 短轴 short axis/ μm	$V/\mu\text{m}^3$
M-Pc2	P	卵圆形	3.38 ± 0.35	2.43 ± 0.17	10.44
	F ₁	卵圆形	3.26 ± 0.36	2.30 ± 0.24	9.03
	F ₂	卵圆形	3.34 ± 0.37	2.24 ± 0.27	8.77
N. b.		卵圆形	3.45 ± 0.15	2.25 ± 0.15	9.14

2.2 M-Pc2 微孢子虫生活史

接种后 6 h 可见球形双核芽体,核呈小球形(图 1-1); 24 h 发育成裂殖体,裂殖体多为球形,以二分裂增殖,分裂旺盛(图 1-2); 48 h 可见到孢子芽、洋梨形短极丝孢子和短极丝孢子发芽后的孢子空壳(图 1-3); 还可见到二次感染体入侵相邻细胞的细胞质(图 1-4); 孢子芽母细胞形态不规则,大多为椭圆形和纺锤形,在细胞的一端或两端有时可见染不上色的高折曲率的小球(图 1-5、1-6); 孢子芽母细胞二分裂形成 2 个双核孢子芽,96 h 孢子芽大量形成(图 1-7); 120 h 出现的成熟的卵圆形双核长极丝孢子(图 1-8).



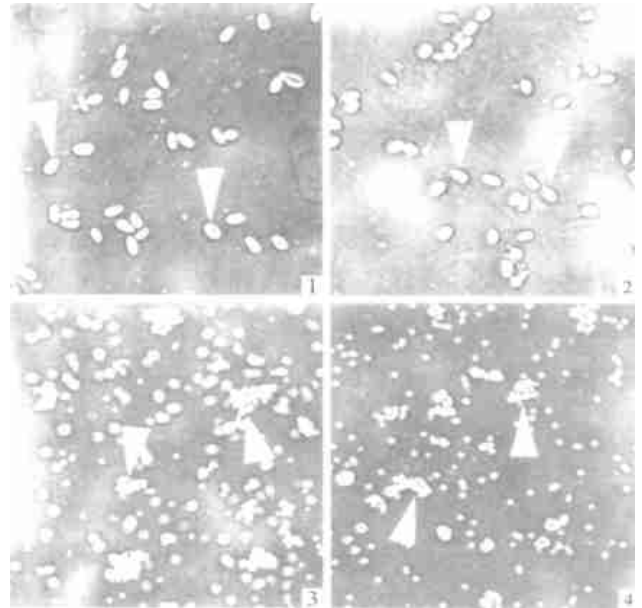
SP: 芽体 sporoplasm; SC: 裂殖体 schizont; SN: 孢子芽母细胞 sporont; SB: 孢子芽 sporoblast; LT: 长极丝孢子 long polar tube spore; ST: 短极丝孢子 short polar tube spore; ES: 孢子空壳 empty spore; SIF: 二次感染体 second infection form; N: 宿主细胞核 nucleus

1. 双核芽体, 6 h(binucleate sporoplasm); 2. 二分裂中的裂殖体, 24 h (schizonts in dividing); 3. 孢子芽、短极丝孢子及发芽后的空壳, 48 h (sporoblasts ST and ES); 4. 二次感染体, 48 h (SIF); 5. 椭圆形孢子芽母细胞, 48 h (oval sporonts); 6. 纺锤形孢子芽母细胞, 48 h (spindle sporonts); 7. 大量孢子芽形成, 96 h (many sporoblasts formed); 8. 长极丝孢子形成, 120 h (LT formed)

图 1 M-Pc2 在家蚕幼虫体内的生活史发育过程(400 \times)Fig. 1 Life cycle of M-Pc2 in silkworm larvae(400 \times)

2.3 M-Pc2 与 N. b. 的血清学关系

M-Pc2 孢子表面吸附大量胶乳粒子,发生了强烈的凝聚现象,与 N. b. 孢子的血清学反应相同,反应为阳性(图 2),说明 M-Pc2 与 N. b. 表面抗原有同源性。



1. 东方粉蝶微孢子虫孢子(M-Pc2 spores); 2. 家蚕微孢子虫孢子(N. b. spores); 3. 东方粉蝶微孢子虫孢子与致敏胶乳血清学反应(+)[Serological reaction between M-Pc2 and sensitized latex(+)] 4. 家蚕微孢子虫孢子与致敏胶乳血清学反应(+)[Serological reaction between N. b. and sensitized latex(+)]

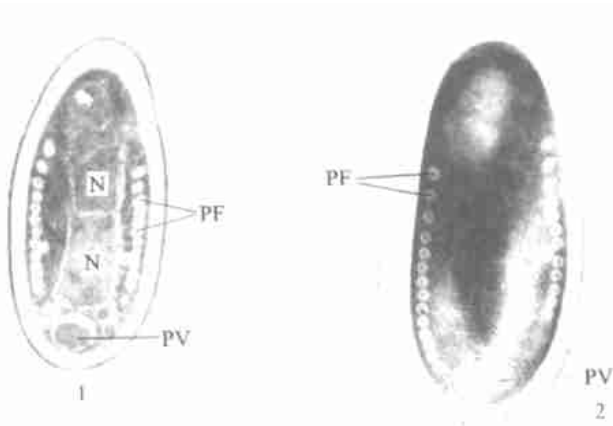
图 2 M-Pc2 和 N. b. 孢子形态及血清学反应(600 \times)Fig. 2 Spores and serological reaction of M-Pc2 and N. b. (600 \times)

2.4 M-Pc2 对家蚕的病原性

在染病家蚕幼虫的中肠肌肉组织、丝腺、生殖器、脂肪组织、马氏管、气管等均检测到 M-Pc2 孢子. 根据统计结果, M-Pc2 对家蚕的感染中量为 1.17×10^5 个/mL, N. b. 对家蚕的感染中量为 9.12×10^3 个/mL, 可以看出, M-Pc2 对家蚕的食下感染致病力比 N. b. 弱 10 倍左右. 在胚种传染调查中发现, 不论是卵壳、蚁蚕及 3 龄蚕均检出孢子, 说明这种微孢子虫可经卵胚种传染家蚕, 但胚种传染率低, 仅为 1.4%, 而 N. b. 对家蚕的胚种传染率达 70% 以上.

2.5 M-Pc2 孢子的超微结构

M-Pc2 孢子极丝 12 ~ 13 圈, 极丝切面可见深浅相间的同心圆结构, 极丝倾斜角大于 58° ; 孢子具双核, 核近方形, 互相靠近, 核膜双层结构; 原生质内可见附着大量核糖体的粗面内质网; 后极泡球形, 至少可见双层膜结构, 有时在后极泡内可见到一些小囊泡(图 3).



1. 孢子的核、极丝和后极泡(12 566 \times) [nuclei (N), polar filaments (PF) and post vacuole (PV) of M-Pc2 (12 566 \times)]; 2. 孢子的极丝和后极泡(16 333 \times) [polar filaments (PF) and post vacuole (PV) of M-Pc2 (16 333 \times)]

图 3 M-Pc2 孢子的超微结构

Fig. 3 Ultrastructure of M-Pc2

3 讨论

M-Pc2 的生活史发育过程中的各个阶段均为双核, 以二分裂增殖, 可见到短极丝孢子和二次感染体, 1 个孢子芽母细胞二分裂形成 2 个孢子芽, 最终形成 2 个双核孢子, 这与电镜下观察 M-Pc2 孢子仅见双核结构相符, 参照 Larsson^[3] 提出的微孢子虫分类标准, 是典型的 *Nosema* 型发育特征, 故应归为 *Nosema* 属。

M-Pc2 孢子外部形态、内部超微结构、血清学反应及生活史发育特征均与 *N. b.* 相似, 故 M-Pc2 应与 *N. b.* 为同属同种, 但其病原性比 *N. b.* 弱; 在发育特征方面, 虽与 *N. b.* 同为 *Nosema* 属, 但 M-Pc2 孢子芽母细胞的形态不规则, 有时可在细胞的两端见到染不上色的高折曲率小球, 这与 *N. b.* 孢子芽母细胞形态多为纺锤形, 通常只在细胞一端有一染不上色的高折曲率小球的现象稍有区别, 故 M-Pc2 应为 *N. b.*

的同种异型。

经 CAB 及 AGRIS 检索, 目前国外仅见 Cheung 等^[4] 报道从东方粉蝶分离到 1 种梅氏微孢子原虫 (*Nosema mesnili*), 该微孢子虫大小为 (3~4) $\mu\text{m} \times$ (1.5~2.0) μm , 与本研究中的微孢子虫 M-Pc2 不论从外部形态大小及生活史发育均存在差异, 是两种不同的微孢子虫; 而国内鲜见有关东方粉蝶微孢子虫的研究报道。

长期以来认为家蚕微孢子病的病原只有 *N. b.*。随着野外昆虫微孢子虫对家蚕的交叉感染使得蚕种检疫中频频检出异型微孢子虫, 这不仅给蚕种检疫带来了极大困难, 而且国内已发生多起由于野外昆虫微孢子虫对家蚕交叉感染而给生产造成重大损失的情况。像东方粉蝶这类昆虫, 本身对桑树无危害, 在防治桑园害虫时, 往往会忽略对这类昆虫的防治。但从东方粉蝶成虫体中分离的 M-Pc2, 试验证明对家蚕兼具有食下传染和胚种传染能力。如果感染家蚕, 就会对蚕种生产构成威胁。因此, 在做好对桑园目的害虫的防治工作时, 也应注意对东方粉蝶的防治。

参考文献:

- [1] 谭业平, 陶涛. 昆虫病毒学[M]. 武汉: 武汉出版社, 1990. 283-285.
- [2] HAN M S, WALTAMABE H. Transovarian transmission of two microsporidia in the silkworm *Bombyx mori* and disease occurrence in the progeny population[J]. *J Invertebr Pathol*, 1988, 51: 41-45.
- [3] LARSSON J I R. Identification of microsporidian genera (Protozoa, Microsporida) — a guide with comments on the taxonomy [J]. *Arch Protistenkd*, 1988, 136: 1-37.
- [4] CHEUNG W W K, WANG J B. Electron microscopic studies on *Nosema mesnili* Paillet (Microsporidia: Nosematidae) infecting the malpighian tubules of *Pieris canidia* larva [J]. *Protozoa*, 1995, 186: 142-148.

Studies on a Microsporidium M-Pc2 Isolated from *Pieris canidia* S.

YANG Qiong¹, XU Xing-yao¹, LU Keng-ming¹, ZHENG Xiang-ming², FANG Ding-jian²

(1 College of Art Design, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China; 2 Sericultural Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: M-Pc2, a microsporidium isolated from *Pieris canidia* S., is oval in shape, binucleate. Spores measured (3.38 \pm 0.35) $\mu\text{m} \times$ (2.43 \pm 0.17) μm . The life cycle in silkworm, *Bombyx mori* conform to Genus *Nosema*. The microsporidium had medium peroral infection and weak transovarian transmission to silkworm.

Key words: microsporidium; *Pieris canidia* S.; *Bombyx mori*; pathogenicities; classification