

# 从甘蓝夜蛾分离的一种微孢子虫生物学特性研究\*

郑祥明 邹宇晓 黄炳辉

(广东省农业科学院蚕业研究所 广州 510640)

卢铿明

黄星光

(华南农业大学蚕桑系 广州 510642) (广东省丝绸集团公司茧丝绸管理部 广州 510180)

**摘 要** 从广州市郊菜地捕捉的甘蓝夜蛾 *Barathra brassicae* L. 幼虫体中分离到一种微孢子虫(简称 *Bab-M*)。孢子呈长卵圆形,大小为  $4.02 \pm 0.36 \mu\text{m} \times 1.99 \pm 0.36 \mu\text{m}$ ;孢子表面抗原与家蚕传统微孢子( *Nosema bombycis*, 简称 *N. b.* )具共同抗原性;*Bab-M* 微孢子虫孢子的内部结构、发育的特征与 *N. b.* 孢子相类似。*Bab-M* 微孢子虫对三龄起蚕感染中量( $\text{IC}_{50}$ )为  $6.03 \times 10^4$  粒孢子,经卵传染频率较高。初步阐明了从甘蓝夜蛾分离的这种微孢子虫与家蚕 *N. b.* 同为 *Nosema bombycis* 种,但存在着变异现象。

**关键词** 微孢子虫,甘蓝夜蛾,家蚕

中图分类号 S884.29 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2000)05-0540-44

自然界昆虫之间存在着复杂的微孢子虫交叉感染网,这一现象已引起人们的重视。为解决经济昆虫微孢子虫病害的防疫,及利用微孢子虫作为微生物杀虫剂应用于农林害虫的生物防治,各国学者纷纷开展昆虫微孢子虫的研究工作。

日本学者对 102 种昆虫检索,在 65 种昆虫中检出微孢子虫,其中 12 种对家蚕具病原性<sup>[1]</sup>。作者等近年来也对 417 种昆虫进行检索,在 49 种昆虫中检出微孢子虫,已知 17 种对家蚕具病原性。另外, Sprague 等发现家蚕 *N. b.* 孢子对 34 种野外昆虫有交叉感染能力<sup>[2]</sup>;广濑安春在实验室确认 *N. b.* 孢子对绝大部分野外昆虫有病原性,但不感染甘蓝夜蛾<sup>[3]</sup>。1997 年春,从广州石牌地区菜地捕捉的蔬菜害虫甘蓝夜蛾幼虫体分离到一种微孢子虫(*Bab-M*),同年对 *Bab-M* 的生物学特性及对家蚕病原性进行研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

从蔬菜害虫甘蓝夜蛾幼虫体分离的微孢子虫,经提纯后置冰箱备用。家蚕微孢子孢子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

**1.2.1 孢子外部形态观察及大小测量** 分别将提纯后的 *Bab-M* 孢子、经家蚕继代的  $\text{F}_2$

\*“九五”国家科技攻关计划(96-616-02),广东省农科院院长基金资助项目

参加工作的还有杨琼、廖森泰、方定坚、徐兴耀及余爱群

作者简介:郑祥明(1952-),女,安徽省合肥市人,广东省农业科学院蚕业研究所研究员,硕士,1996 年赴日本九州大学研修,主要从事家蚕及昆虫生理病理研究

收稿日期:1999-08-10,修回日期:2000-01-03

代孢子置 600 倍光学显微镜下观察,并以测微尺测量孢子大小。

1.2.2 孢子血清学类型测定:采用致敏胶乳玻片凝集法。以抗 *N. b.* 孢子表面抗原 IgG 致敏直径为  $0.81\mu\text{m}$  的胶乳粒子作为检测用的抗体,以提纯后的 *Bab-M* 孢子为待测抗原。检测时抗体、抗原各取一滴滴于干净载玻片上,混匀,置  $27^{\circ}\text{C}$  10min 后于显微镜下观察孢子与乳胶粒子反应的情况。

1.2.3 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 型电子显微镜下观察。

1.2.4 微孢子虫生活史观察:二令起蚕添食  $10^7$  粒孢子/mL *Bab-M* 孢子,6h 开始取后部中肠涂片,以后每天涂片一次,至新孢子形成。涂片用 Giemsa 染色,显微镜下观察。

1.2.5 家蚕病原性调查:①食下感染:家蚕继代后的 *Bab-M*  $F_1$  代孢子为供试材料,*N. b.* 为对照,将孢子液配成  $10^7\sim 10^3$  粒孢子/mL 10 倍系列稀释液,给三令起蚕添食 12h 后,正常饲育。接种 10d 后逐条蚕镜检,调查感染数,按 Reed—Muench 法计算  $\text{IC}_{50}$ 。②胚种传染:五令起蚕添食  $10^6$  粒孢子/mL 经蚕继代的  $F_1$  代 *Bab-M* 孢子液,常规饲育,单蛾制种。将镜检有大量孢子的母蛾所产的卵进行试验。每卵圈分成 2 份,即时浸酸、催青并孵化后,一份检查蚁蚕和卵壳、一份正常饲养至 3 令蚕进行调查。将待检蚕研磨过滤,离心后镜检,观察有无孢子存在,判别经卵传染性。③寄生组织:将  $10^8$  孢子/mL *Bab-M* 孢子液给二令起蚕添食 12h,分别在接种后 7d、10d 解剖蚕体,取各种组织以无菌水冲洗数次,镜检有无孢子。

2 结果

2.1 孢子形态大小

在光学显微镜下,原代 *Bab-M* 孢子为长卵圆形(图 1),比家蚕 *N. b.* 孢子细长,孢子总体整齐度较 *N. b.* 孢子差;*Bab-M* 经家蚕继代后,孢子形态大小与原孢子有明显差异,变异后的 *Bab-M* 孢子外部形态与 *N. b.* 孢子接近(见表 1)。

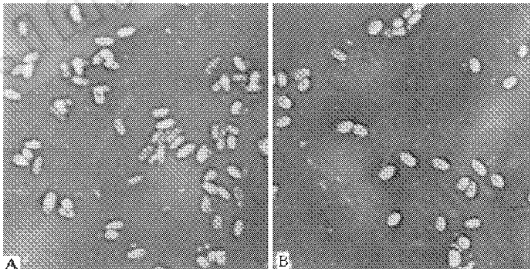


图 1 甘蓝夜蛾微孢子虫孢子( *Bab-M* )  
和家蚕微孢子虫孢子( *N. b.* )

Fig.1 Spores of *Bab-M* and *N. b.*  
A. *Bab-M*; B. *N. b.*

表 1 *Bab-M* 孢子与 *N. b.* 孢子形态大小比较

Table 1 Comparison of *Bab-M* and *N. b.* on morphology and size

Microsporidium name	Shape	Major axis/ $\mu\text{m}$	Minor axis/ $\mu\text{m}$	Major axis/minor axis	Volumn/ $\mu\text{m}^3$
<i>Bab-M</i> (p)	Long-ovoid	$4.02\pm 0.36$	$1.99\pm 0.36$	2.02	8.33
<i>Bab-M</i> ( $F_1$ )	Elliptic	$3.20\pm 0.34$	$2.05\pm 0.20$	1.56	7.07
<i>N. b.</i>	Elliptic	$3.41\pm 0.15$	$2.20\pm 0.15$	1.53	8.58

Note :Volumn =  $\pi/6\times \text{major axis}\times \text{minor axis}^2$  n=20  
( $F_2$ )  $F_2$  generation propagated in silkworm

2.2 *Bab-M* 孢子表面抗原测试结果

在显微镜下可观察到, *Bab-M* 孢子表面粘附着 4~6 粒胶乳粒子(图 2),说明 *Bab-M* 孢子与抗 *N. b.* 孢子致敏胶乳粒子有凝集现象,即是说与 *N. b.* 存在着共同抗原性。

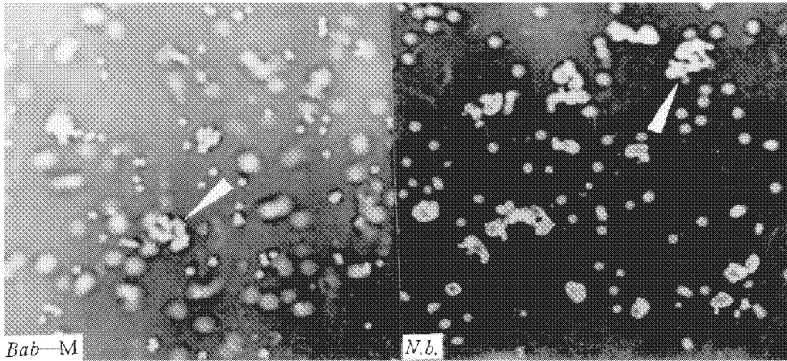


图 2 抗 *N. b.* 孢子 IgG 致敏胶乳粒子与两种孢子凝集反应

Fig.2 Latex agglutination test of spores of *Bab-M* and *N. b.*

( Latex particles were sensitized with the antibody to spores of *N. b.* )

2.3 孢子的超微结构

*Bab-M* 孢子的超微结构见表 2 ,图 3。

表 2 *Bab-M* 孢子与 *N. b.* 孢子超微结构

Table 2 Ultrastructure of *Bab-M* and *N. b.*

Microsporidium name	Spore wall/minor axis	Nucleate number	Posterior vacuole	Coils of PF/Coil	Angle of tilt(°)
<i>Bab-M</i>	1/10	binucleate	deep color	12~13	45~50
<i>N. b.</i>	1/10	binucleate	deep color	12~13	40~50

PF Polar filament



图 3 两种微孢子虫孢子的超微结构( 18000× )

Fig.3 Ultrastructure of two spores

a. *Bab-M* b. *N. b.*

综合试验结果 ,*Bab-M* 孢子与 *N. b.* 孢子超微结构相似。

2.4 微孢子虫的生活史

家蚕食下 *Bab-M* 孢子后 ,6h 可在中肠后部细胞的细胞质见到双核芽体( 图 4-1 );24h 在细胞质观察到椭圆形的双核后期裂殖体( 图 4-2 );48h 在寄主中肠细胞的细胞质出现大量的裂殖体 ,同时在一端具 Giemsa 不染色高折屈率小球的孢子芽母细胞也开始出现( 图 4-3 );在这阶段形成的孢子芽母细胞按二分裂形成 2 个短极丝孢子的孢子芽 ,接着短极丝孢子也形成( 图 4-4 );48~72h 可观察到二次感染体侵入相邻寄主细胞( 图 4-5 );72h 以后 ,裂殖体大量繁殖 ,双核孢子芽母细胞形成( 图 4-6 );

此时的孢子芽母细胞按二分裂形成 2 个长极丝孢子的孢子芽( 图 4-7 );96~120h 大量的长极丝孢子出现( 图 4-8 )。从芽体侵入寄主细胞 ,到新孢子形成 ,需要 5~6d。

2.5 *Bab-M* 微孢子虫对家蚕病理性

2.5.1 食下感染 接种后第 10d 逐条蚕镜检 调查发病蚕数 按照 Reed—Muench 法计算

继代后的 *Bab*-MF<sub>1</sub> 微孢子虫对 3 龄起蚕的感染中量 IC<sub>50</sub> 为  $6.03 \times 10^4$  个孢子,而 *N. b.* 孢子对 3 龄起蚕感染中量 IC<sub>50</sub> 为  $7.94 \times 10^3$  个孢子。说明 *Bab*-M 孢子对家蚕食下感染能力比 *N. b.* 稍弱。

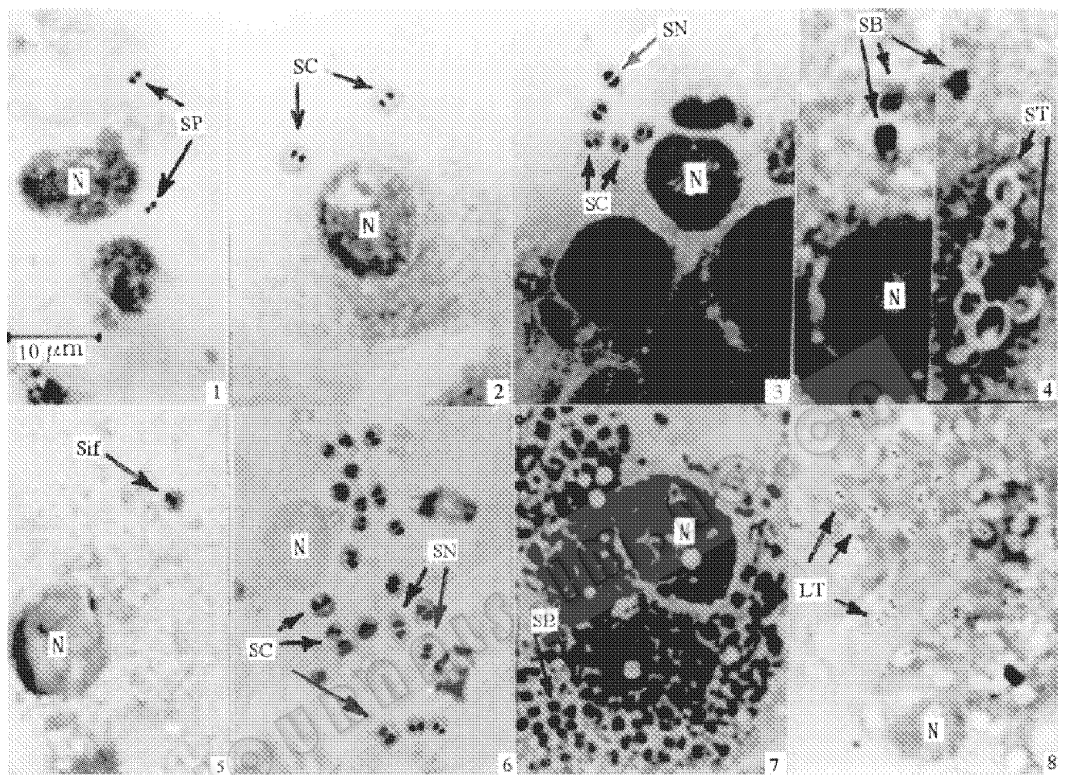


图 4 *Bab*-M 微孢子虫在家蚕组织细胞的发育周期

Fig. 4 Life cycle of *Bab*-M in tissue cell of silkworm

SP : Sporoplasm ; SC : Schizont ; SN : Sporont ; SB : Sporoblast ; ST : Short polar tube type spore ;  
Sif : Second infective form ; LT : Long polar tube type spore ; N : Host cell nucleus.

1. Binucleate sporoplasm 6h p. i. ; 2. Later schizont 24h p. i. ; 3. Dividing schizonts and initial sporont 48h p. i. ; 4. Sporoblast of short polar tube type spore and short polar tube type spore 48h p. i. ; 5. The second infective form is infecting the nearby tissue cells 48~72h p. i. ; 6. Schizont multiplied in large number and binucleate sporonts were visible 72h p. i. ; 7. Long polar tube type sporoblast formed 72h p. i. ; 8. Mature long polar tube type spores 96~120h p. i.

**2.5.2 胚种传染 :**供试的 15 个卵圈 ,其中 6 个卵圈在蚕期检出孢子。卵圈孢子检出率为 40%。

**2.5.3 寄生部位 :**接种后 7d ,在中肠、马氏管、肌肉、脂肪体均能检测到孢子 ,第 10d 在蚕体各器官均能检测到孢子。

3 讨论

**3.1 从蔬菜害虫甘蓝夜蛾幼虫中分离到一种微孢子虫 *Bab*-M ,孢子的外部形态为长卵圆形 ,与椭圆形的家蚕 *N. b.* 孢子有明显差异。*Bab*-M 孢子经蚕体若干次继代以后 ,长径**

从原来的 4.02 $\mu\text{m}$  缩短至 3.20 $\mu\text{m}$  ,短径比原来稍宽 ,经蚕体若干次继代后的 *Bab-M* 孢子 ,外部形态与 *N. b.* 孢子接近 ;*Bab-M* 孢子的表面抗原类型、孢子的内部结构与 *N. b.* 孢子类似 ;*Bab-M* 微孢子虫生活史具典型的 *Nosema* 属发育特征 ,同时其发育各阶段的形态、核数、时间均与 *N. b.* 孢子相类似。从 *Bab-M* 微孢子虫生物学特性来看 ,*Bab-M* 应与 *N. b.* 同为 *Nosema* 属 *bombycis* 种的微孢子虫。

3.2 *Bab-M* 孢子外部形态与家蚕 *N. b.* 孢子有明显差异 ,对家蚕病原性比 *N. b.* 弱 ,这些差异认为是在异种寄生寄生时 ,由于生活环境的变化所产生的变异现象。

3.3 日本学者认为家蚕 *N. b.* 孢子可感染多种野外昆虫 ,但对甘蓝夜蛾不感染<sup>[3]</sup>。我们通过对甘蓝夜蛾分离到的 *Bab-M* 微孢子虫的研究及分类结果 ,认为 *Bab-M* 与 *N. b.* 为同属同种微孢子虫 ,说明家蚕 *N. b.* 孢子有可能对甘蓝夜蛾有交叉感染能力。这一观点与文献报导有差异 ,有待实验证实。

3.4 本试验结果提示 ,家蚕微粒子病的防治 ,要制定杜绝野外昆虫微孢子虫对家蚕交叉感染的防病措施。

参 考 文 献

[ 1 ] 广瀨安春.日本蚕丝研究 ,1979 ,**111** ,118~123.  
[ 2 ] Sprague. Comparative Pathobiology. New York :Plenum Press ,1977 ,**2** 31~334.  
[ 3 ] 广瀨安春.日本蚕丝研究 ,1977 ,**104** :104~108.  
[ 4 ] Kawarabata T , Ishihara R. *J Invertebr Pathol* ,1984 ,**44** 52~62.

STUDY ON THE BIOLOGY FEATURE AND PATHOGENICITIES TO  
SILKWORM OF A MICROSPORIDIUM ISOLATED  
FROM *BARATHRA BRASSICAE* L. \*

Zheng Xiangming   Zhou Yuxiao   Huang Binhui

( Institute of sericulture , Guangdong Academy of Agricultural Sciences , Guangzhou 510640 )

Lu kengming

( South China Agricultural University , Guangzhou 510642 )

Huang Xingguang

( Administrative Department of Cocoon and Silk , Guangdong Silk Corporation( Group ) , Guangzhou 510180 )

**Abstract :** A microsporidium ( called as *Bab-M* ) was isolated from *Barathra brassicae* L. captured from suburban vegetable plot of Guang Zhou. The spores were long-ovoid in shape and  $4.02 \pm 0.36\mu\text{m} \times 1.99 \pm 0.36\mu\text{m}$  in size. Immunologically the microsporidium shared spore surface specific antigen(s) with *N. bombycis*. The ultrastructure and life cycle of *Bab-M* were similar to that of *N. b.* . The rate of transovarian transmission was high. The initial conclusion was that *Bab-M* should be referred to as *Nosema bombycis* , but there was variation between them.

**Key words :** Microsporidium , *Barathra brassicae* L. , Silkworm

\* Project of Chinese National Programs for Science and Technology Development ( 96-616-02 )  
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>