

文章编号: 0454-6296 (2000) 增刊-0109-05

蝗虫微孢子虫对蝗虫脂肪含量的影响

陈建新, 沈 杰, 宋敦伦, 张 龙, 严毓骅

(中国农业大学植物保护学院, 北京 100094)

摘要: 用东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* 作为活体寄主, 将 4 龄蝗蛹接种蝗虫微孢子虫 *Nosema locustae* 后, 对虫体总脂含量和血淋巴中的甘油酯含量、脂肪酶活力进行了测定, 结果表明: 蝗虫微孢子虫的寄生可导致东亚飞蝗虫体总脂含量和血淋巴甘油酯含量大幅度下降及血淋巴脂肪酶活力大幅度上升。根据病虫生理指标提出了一种新的病级鉴定方法。

关键词: 东亚飞蝗; 蝗虫微孢子虫; 甘油酯; 脂肪酶; 病级

中图分类号: S476.14

文献标识码: A

蝗虫微孢子虫 *Nosema locustae* 是蝗虫等直翅目昆虫的专性寄生的单细胞原生动植物, 主要侵染蝗虫等宿主的脂肪体^[1~3], 可引起蝗虫等宿主的慢性病, 可做为蝗虫种群密度的长期控制因素^[4]。

迄今为止, 有关蝗虫微孢子虫方面的研究已经取得了一定的成果^[5~7], 然而对蝗虫微孢子虫致病机制的生理生化基础研究和病虫的生理诊断还未见报道, 本文主要从蝗虫微孢子虫对蝗虫生理生化的影响出发, 从生理学角度探讨蝗虫微孢子虫对蝗虫的致病机制, 并找出了一种根据生理指标迅速有效地检测出蝗虫个体是否感病, 以及感病程度的新方法。解决预测预报中尚无迅速准确地进行早期诊断的方法问题。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

病原: 蝗虫微孢子虫浓缩液, 由中国农业大学植物保护学院昆虫生物防治室提供。

试虫: 东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* 4 龄蝗蛹及成虫。

蝗卵由中国农业大学植物保护学院昆虫生物防治室提供, 孵化后, 饲养蝗蛹至 4 龄, 以麦苗浸泡法 (孢子浓度为每毫升 10^7 个孢子) 接种 1 天, 然后放于光照培养箱中以新鲜的小麦叶片饲养。培养箱温度为 29℃, 相对湿度为 70% 左右。

1.2 病级鉴定方法

取 1 头供试蝗虫, 在研磨器中磨碎, 加 10 mL 水, 过滤后在 400 倍镜下观察 3~5 个视野, 计算平均每个视野孢子数, 按孢子数分级, 无孢子为 0 级, 每个视野 0~1 个孢子为 1

级, 每个视野 1~5 个孢子为 2 级, 每个视野 5~100 个孢子为 3 级, 每个视野大于 100 个孢子为 4 级, 每个视野孢子密集成片为 5 级^[8]。

1.3 蝗虫总脂含量的测定

采用 Folch (1957) 改良法^[9]。每一数据点测虫 10 头, 取平均值。

1.4 蝗虫血淋巴中甘油酯含量的测定

采用重复性较好的乙酰丙酮法^[10]。重复数同上。

1.5 蝗虫血淋巴中脂肪酶活力的测定

采用滴定法^[11]。重复数同上。

1.5.1 酶活力测定: 取血淋巴 25 μL , 加缓冲液 3 mL, 离心 (15 000 r/min) 后将上清液作为酶液。加 3 mL pH7.5、0.025 mol/L 磷酸缓冲液和 2 mL 聚乙烯醇橄榄油乳化液于三角烧瓶中, 置 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min。加入酶液 1 mL, 立即开始精确计时, 40 $^{\circ}\text{C}$ 下 15 min 后, 立即加入 10 mL 95% 乙醇终止酶反应。加酚酞指示剂 2~3 滴, 以 0.05 mol/L NaOH 标准溶液滴定到微红色, 记下消耗的体积。对照样品的测定, 先加入 15 mL 95% 的乙醇后, 再加入酶液 1 mL, 其它同上。用考马斯亮兰法^[12]测定酶液样品蛋白质含量, 用 BSA 作标准曲线, 测定 595 nm 的 OD 值。

1.5.2 结果计算: 酶活力/g = (A - B)N / (10tW)

A 为酶液样品消耗的氢氧化钠毫升数; B 为对照液样品消耗的氢氧化钠毫升数; N 为每毫升 0.05 mol/L 氢氧化钠所含氢氧化钠的微克分子数 (50); W 为酶液样品蛋白质含量克数; t 为酶反应时间 (15 min)。

2 结果与分析

2.1 接种 20 天后感染状况

以 4 龄蝗蚬接种微孢子虫 20 天后, 镜检 150 头成虫, 感染率为 100%, 死亡率为 75%, 各病级分布如图 1 所示 (图中 6 级为死亡)。说明了微孢子虫对寄主的感染力非常强, 致死率较高。

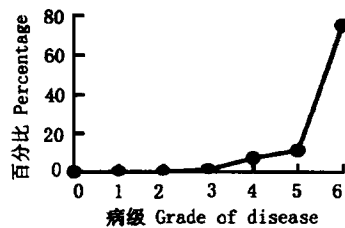


图 1 接种 20 天后各病级分布

Fig. 1 Distribution of grades of disease

2.2 蝗虫的总脂含量

虫体总脂含量接种组随时间而大幅下降, 未接种组 (对照组) 随时间略有上升, 如图 2 所示。说明微孢子虫在寄主脂肪体内大量增殖并消耗了寄主的大量营养和能源物质。接种后饲养 20 天后, 鉴定病级, 随病级的增加总脂含量在 0~1 级和 3~5 级大幅下降, 在 1~3 级降幅略小, 如图 3 所示。

2.3 血淋巴甘油酯的含量

接种后蝗虫血淋巴甘油酯的含量随着时间增长而迅速下降, 而未接种的蝗虫血淋巴含量略有增加, 如图 4 所示。说明健虫在起飞前甘油酯作为能源物质动用的少, 使其浓度稍有升高, 而病虫的血淋巴甘油酯浓度随饲养时间呈大幅度下降趋势, 到 20 天时, 已经不足 0.5 mmol/L, 这主要是由于微孢子虫的大量增殖消耗了蝗虫脂肪体内的甘油酯, 导致脂肪体向血

淋巴中释放甘油酯的量大大降低。接种后饲养 20 天后, 鉴定病级, 甘油酯含量在 0~1 级和 3~4 级有大幅度下降, 1~3 级和 4~5 级下降幅度不大, 如图 5 所示。

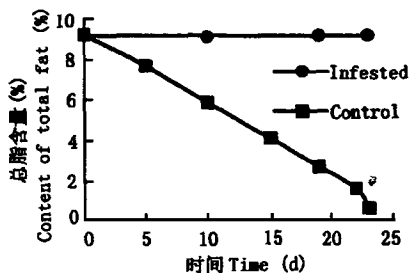


图 2 总脂含量与接种后饲养时间的关系

Fig. 2 Relation between content of total fat and time

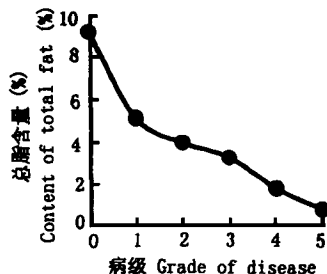


图 3 总脂含量与病级关系

Fig. 3 Relation of content of total fat and grades of disease

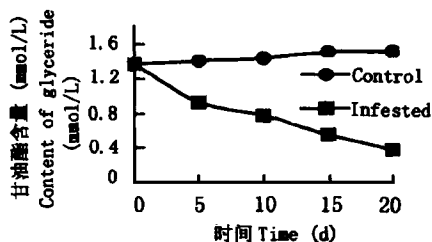


图 4 血淋巴甘油酯含量与接种后时间的关系

Fig. 4 Relation between content of glyceride in haemolymph and time

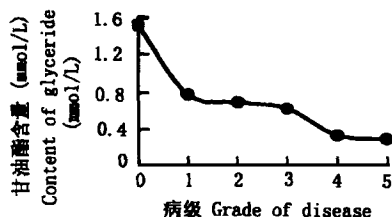


图 5 血淋巴甘油酯含量与病级的关系

Fig. 5 Relation between content of glyceride in haemolymph and grades of disease

2.4 血淋巴脂肪酶的活力

未接种组中的脂肪酶活力在 10 天以前基本稳定, 在 10~15 天略有下降, 15~20 天又趋于稳定。接种组随饲养时间酶活力除 5~10 天升幅较小外, 一直呈大幅上升趋势, 如图 6 所示。说明蝗蛹 (0~10 天) 要完成它的生长发育, 所需能量较多, 酶活力较高, 而它羽化为成虫后 (15~20 天), 在起飞前蝗虫各个器官基本成熟, 所需能量减少, 酶活力下降并基本稳定。当蝗虫感染微孢子虫后, 由于微孢子虫在蝗虫体内迅速增殖, 大量消耗蝗虫体内的能源物质, 故酶活力升高, 20 天后达到了 16/g 以上。接种后饲养 20 天后, 鉴定病级, 脂肪酶活力在 0~1 级和 3~5 级随病级的增加而大幅升高, 在 1~3 级基本保持平稳, 如图 7 所示。

3 讨论

根据本文结果, 4 龄蝗蛹在感染微孢子虫后, 由于微孢子虫在蝗虫体内迅速增殖, 大量消耗寄主体内的营养物质, 导致寄主总脂含量大幅下降, 血淋巴脂肪酶活力迅速升高, 血淋巴能源库动态平衡遭受严重破坏, 血淋巴甘油酯含量大幅下降。这是感病蝗虫表现生长、发育和生殖不利, 包括脱皮不利, 常出现畸形, 取食量降低, 发育期延长, 寿命缩短, 丧失生殖

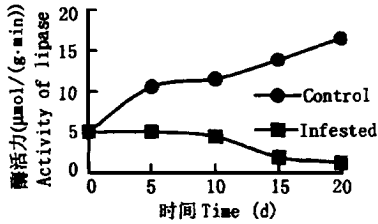


图 6 脂肪酶活力与接种后时间的关系

Fig. 6 Relation between activity of lipase and time

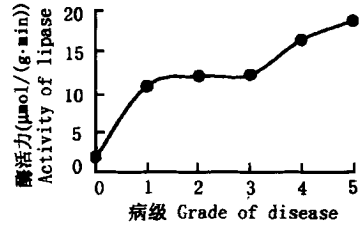


图 7 脂肪酶活力与病级的关系

Fig. 7 Relation between activity of lipase and grades of disease

能力^[13],飞行能力消弱,甚至没有飞行能力^[14]等一系列病征生理学方面的主要原因之一。

由于现行的根据镜检孢子数来定病级的方法,只能在接种 15 天后才能观察到孢子,并且还忽略了微孢子虫其它的生活史形态,因此在病虫鉴定的时间性和准确性上存在局限性。根据本文结果,在接种 20 天后,按现行病级鉴定方法,病虫在 1~3 级间各生理指标变化不大(图 3、图 5、图 7),建议以虫体总脂含量和血淋巴甘油酯含量、血淋巴脂肪酶活力为指标(图 2、图 4、图 6),以 4 天为一级,作如下的微孢子虫病分级标准(表 1)(在实际鉴定过程中可以根据条件取一种指标),这样不仅可在蝗虫感病早期(5 天之内)即可进行鉴定,而且在病级的鉴定上更准确,可重复性更好。

表 1 蝗虫微孢子虫病分级标准

Table 1 Grade standard of *Nosema locustae* disease

病级 Grade of disease	总脂含量 (%) Content of total fat	血淋巴甘油酯含量 (mmol/L) Content of glyceride in haemolymph	血淋巴脂肪酶活力 (μmol/(g·min)) Activity of lipase in haemolymph
0	>8.0	>1.3	<8.0
1	6.5~8.0	1.1~1.3	8.0~10.0
2	5.0~6.5	0.9~1.1	10.0~12.0
3	3.5~5.0	0.7~0.9	12.0~14.0
4	2~3.5	0.5~0.7	14.0~16.0
5	<2	<0.5	>16.0

在应用微孢子虫治蝗地区,采用本文的蝗虫微孢子虫病的诊断及病级标准,可及时准确地评价蝗群中微孢子虫病的流行程度,判断是否需要化学防治。

致谢 刘小侠同学参加了部分实验工作,特此致谢!

参 考 文 献 (References)

- [1] Canning E U. A new microsporidian, *Nosema locustae* n. sp. from the fat body of the African migratory locust, *Locusta migratoria migratorioides* (R. & F.). *Parasitology*, 1953, 43: 287~290
- [2] Canning E U. The life cycle of *Nosema locustae* Canning in *Locusta migratorioides* (R. & F.) and its infectivity to other hosts. *J. Invert. Pathol.*, 1962a, (4): 237~247

- [3] Canning E U. The pathogenicity of *Nosema locustae* Canning. J. Insect Pathol., 1962b, (4): 248~256
- [4] Henry J E, Oma E A. Pest control by *Nosema locustae*, a pathogen of grasshoppers and crickets. Microbial control of pests and plant diseases (1970~1980). H. D. Burges ed. Academic Press, 1981, Chapter 30, 573~586
- [5] 严毓骅. 微孢子虫治蝗技术的进展. 见: 中国农业科学院生物防治研究所编. 全国生物防治学术讨论会论文集. 1991, 21~23
- [6] 严毓骅, 张 龙. 我国蝗虫微孢子虫治蝗的进展. 植保技术与推广, 1994, (1): 43
- [7] 严毓骅. 蝗虫微孢子虫治蝗——一种持续性植物保护新技术. 第六届全国杀虫微生物学术讨论会会议程与论文摘要 (广州). 1995, 8~9
- [8] Henry J E. Experimental application of *Nosema locustae* for control of grasshoppers. J. Inver. Path., 1971, 18: 389~394
- [9] 冯 慧编. 昆虫生物化学分析法. 北京: 农业出版社. 1989, 28~29
- [10] 陈长琨编. 昆虫生理生化实验. 北京: 农业出版社. 1996, 57~60
- [11] 朱 俭编. 生物化学实验. 上海科学技术出版社. 1981, 190~193
- [12] 西北农业大学编. 基础生物化学实验指导. 陕西科技出版社. 1986, 66~68
- [13] 曹 春. 蝗虫微孢子虫致病机制的研究. 北京农业大学研究生论文. 1992, 19
- [14] 张 龙, 严毓骅, 李光博等. 蝗虫微孢子虫病对东亚飞蝗飞翔能力的影响. 草地学报, 1995, (3): 324~327

Effect of *Nosema locustae* on the content of fat in *Locusta migratoria manilensis*

CHEN Jian-xin, SHEN Jie, SONG Dun-lun, ZHANG Long, YAN Yu-hua

(Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract: In this study the authors using *Nosema locustae* as a parasite on *Locusta migratoria manilensis*, measured the content of glyceride and lipase activity in haemolymph and the total fat of the locust infested. The results manifest that *N. locustae* can cause the content of glyceride in haemolymph and the total fat of *L. migratoria manilensis* decline rapidly and the lipase activity in haemolymph rise rapidly. A new identifying method of grade of disease according to the physiological guideline is suggested.

Key words: *Locusta migratoria manilensis*; *Nosema locustae*; glyceride; lipase; grade of disease