

蝗虫微孢子虫 *Nosema locustae* 对红胫戟纹蝗 *Dociostaurus kraussi kraussi* 致病性及呼吸代谢的影响*

扈鸿霞^{1**} 王 晗¹ 石旺鹏² 于 非¹ 王志勇¹ 季 荣^{1***}

(新疆师范大学生命科学学院, 中亚区域动物资源保护及有害生物控制实验室, 乌鲁木齐 830054;

2. 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100000)

摘 要 【目的】研究蝗虫微孢子虫 *Nosema locustae* 对红胫戟纹蝗 *Dociostaurus kraussi kraussi* 致病性及呼吸代谢的影响, 为筛选蝗虫微孢子虫适宜的新疆本地的活体增殖寄主提供实验依据。【方法】采用逐头口服法感染红胫戟纹蝗, 以镜检法检测蝗虫感染情况, 并用呼吸仪测量试虫的呼吸代谢。【结果】在 6.5×10^5 个孢子/头的感染剂量下, 红胫戟纹蝗的感染率和死亡率分别为 41.70% 和 72.22%。蝗虫微孢子虫的感染剂量与其毒力高度相关 ($r^2=0.961$), LD_{50} 为 1.7088×10^4 个孢子/头; 随孢子浓度增加和感染时间延长, 试虫的 CO_2 释放率显著降低 ($P<0.05$), 但耗氧率没有显著变化。【结论】红胫戟纹蝗被微孢子虫感染后表现出典型症状, 高剂量组感染下死亡率达到 70% 以上, 由此推断红胫戟纹蝗可作为微孢子虫在新疆本地的潜在增殖寄主。
关键词 蝗虫微孢子虫, 红胫戟纹蝗, 致病性, 呼吸代谢

Pathogenicity of *Nosema locustae* to *Dociostaurus kraussi kraussi*

HU Hong-Xia^{1**} WANG Han¹ SHI Wang-Peng² YU Fei¹ WANG Zhi-Yong¹ JI Rong^{1***}

(1. School of Life Sciences, Xinjiang Normal University, The Key Laboratory of Animal Resource Protection and Pest Control in Central Asia, Urumqi 830054; 2. College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100000, China)

Abstract [Objectives] To study the pathogenicity of *Nosema locustae* to *Dociostaurus kraussi kraussi*, and to provide an experimental basis for screening living hosts of *N. locustae* in Xinjiang. [Methods] *D. kraussi kraussi* were orally infected with *Nosema locustae* and the virulence and effects of fungal infection on the host respiratory metabolism were determined. [Results] The results show that, at a dose of 6.5×10^5 spores, the infection and mortality of *D. kraussi kraussi* were 41.7% and 72.22%, respectively. There was good correlation between infective dose and virulence of *N. locustae* ($r^2=0.961$), the LD_{50} was 1.7088×10^4 spores. Compared to the control, increasing spore concentration and infection time significantly decreased CO_2 emissions ($P<0.05$). [Conclusion] *N. locustae* can infect *D. kraussi kraussi* with high lethality and has significant effects on the hosts' respiratory metabolism.

Key words *Nosema locustae*, *Dociostaurus kraussi kraussi*, pathogenicity, respiratory metabolism.

* 资助项目: 科技支疆项目 (201291136); 博士科研启动基金项目 (XJNUBS1216); 校级重点实验室招标课题

**E-mail: huhongxia111@126.com

***通讯作者, E-mail: jirong@xjnu.edu.cn

收稿日期: 2013-08-12, 接受日期: 2013-12-04

微孢子虫 *Microsporidia* 是一类专性细胞内寄生的单细胞真核生物, 具有较为独特的结构和生活史。迄今为止, 已报道的微孢子虫有 160 个属, 1 300 余种, 广泛寄生于脊椎动物 (包括人类) 和无脊椎动物 (Bigliardi and Sacchi, 2001), 蝗虫微孢子虫是一种专性寄生直翅目昆虫的原生动物, 主要感染蝗虫的脂肪体 (Plischuk *et al.*, 2013)。蝗虫微孢子虫具有感染力强, 体外存活能力强, 既能水平传播又能垂直传播的特点, 采用蝗虫微孢子虫治理蝗虫是一种持久、低耗和环境友好的生物防治措施。20 世纪 80 年代初期, 蝗虫微孢子虫在美国成为第一个注册的生物制剂, 并商品化生产用于草原蝗虫的防治 (Henry, 1971)。2005 年阿根廷学者证实了在首次施用微孢子虫 11 年后, 蝗虫体内仍然能检测到大量孢子 (Lange and Azzaro, 2008), 表明蝗虫微孢子虫在蝗虫种群中具有传播和流行能力。

蝗虫微孢子虫治蝗在中国青海和内蒙古蝗区有大面积长期应用的报道 (巩爱岐等, 2003; 李鹏等, 2006), 并取得了较好的治蝗效果。20 世纪 80 年代王丽英等 (1987, 1994) 在新疆塔城、巴里坤和木垒等蝗区进行了小范围应用试验, 但至今未在新疆大面积推广应用, 很大程度上是因为还未掌握微孢子虫对新疆优势蝗虫种类的致病特性, 尚未筛选出微孢子虫在新疆本地的活体增殖寄主。

本文以新疆草原优势蝗虫——红胫戟纹蝗 *Dociostaurus kraussi kraussi* 为对象, 进行室内蝗虫微孢子虫对其致病性及呼吸代谢影响的研究, 获得感染红胫戟纹蝗最佳微孢子虫感染剂量范围, 掌握其呼吸代谢的变化特征, 为筛选新疆本地繁

殖蝗虫微孢子虫的寄主提供数据资料, 以期为该生物制剂在新疆蝗虫防治中的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 蝗虫微孢子虫

蝗虫微孢子虫浓缩液由中国农业大学农业部生物防治重点开放实验室提供。

1.2 试虫

红胫戟纹蝗蝗蛹于 2013 年 5 月采自新疆玛纳斯县南山牧场, 室内饲养 3 d 后, 选取 3 龄蝗蛹供试。饲养条件: 人工气候箱 (浙江 RTOP-430B) 中饲养, 温度 $26^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 30%, 24 h 光照。

1.3 浓度配制

将浓缩的蝗虫微孢子虫孢子原液 10 倍稀释后, 显微镜下用血球计数板测定浓度。然后将其用无菌水稀释成 1.3×10^8 、 1.3×10^7 和 1.3×10^6 个孢子/mL 待用。

1.4 接种方法

参考 Huang 和 Solter (2013) 的接种方法进行。供试蝗蛹于接种前饥饿 4 h 后用微量移液器吸取不同浓度的微孢子液 5 μL 缓慢滴加于其口器上, 待其吮吸完全后将蝗蛹放回笼中继续饲养。每个浓度接种 60 头蝗蛹, 分两笼, 置于人工气候培养箱中饲养, 每日固定时间饲喂新鲜小麦叶片。

1.5 微孢子镜检

将逐日死亡的供试虫体于 -20°C 冷冻待检, 对感染 21 d 后仍存活的蝗虫单独冷冻。镜检时,

* 资助项目: 科技支疆项目 (201291136); 博士科研启动基金项目 (XJNUBS1216); 校级重点实验室招标课题

**E-mail: huhongxia111@126.com

***通讯作者, E-mail: jirong@xjnu.edu.cn

收稿日期: 2013-08-12, 接受日期: 2013-12-04

将冷冻试虫单头置于研钵中,加入 1 mL 蒸馏水研磨后过滤,显微镜放大 400 倍用血球计数板常规方法计数,并对感染微孢子虫的程度进行定级。通过镜检检测蝗虫体内感染的微孢子数,每个视野内没有孢子为 0 级,每个视野内不足 1 个孢子为 1 级,每个视野有 1~5 个孢子为 2 级,每个视野内 6~100 个孢子为 3 级,每个视野内多于 100 个孢子为 4 级,每个视野内布满孢子为 5 级,检测方法参考丁晓宇和张龙(2009)的方法。

1.6 呼吸代谢测定

选取体重相近的试虫称重后放入多通道昆虫呼吸仪(Sable System International Inc)的呼吸室内,每个呼吸室中放置 2 头试虫,分别测量不同感染剂量和感染时间试虫的 CO_2 释放率和耗氧率。控制进气流速为 125 mL/min。试虫静置 30 min 后进行测量。每 90 s 记录一个数据,每头试虫测定时间为 30 min。对照组及不同感染剂量分别测定 12 头试虫。实验数据由计算机软件 ExpeData 采集并加以分析。

1.7 数据统计与分析方法

死亡率(%) = 死虫数/试虫数 $\times 100$,

校正死亡率(%) = (处理组死亡率 - 对照组死亡率) / (1 - 对照组死亡率) $\times 100$,

感染孢子率(%) = 感染微孢子虫数/试虫数 $\times 100$ 。

实验数据采用 SPSS 软件进行回归分析, t -检验进行差异显著性分析。计算 LD_{50} 和 LT_{50} 及相关系数。

2 结果与分析

2.1 症状观察

蝗虫微孢子虫感染 3 龄红胫戟纹蝗后,初期无明显病症。当蝗蛹进入成虫期后,感染严重

的虫体出现典型的蝗虫微孢子虫感染症状,身体呈红褐色,腹部体节伸长,松软无力,采食量下降,活动减弱。

2.2 不同剂量蝗虫微孢子虫对红胫戟纹蝗的致病力

不同剂量微孢子虫对试虫的校正死亡率见表 1。结果表明,随着接种微孢子虫的剂量增加,试虫累计死亡率随之增加。高剂量组(6.5×10^5 个/头)蝗虫的死亡率达到 72.22%,低剂量组(6.5×10^3 个/头)试虫的死亡率仅为 11.11%,各处理组的累计死亡率随感染时间延长而增加。镜检发现高剂量组的试虫感染率高达 41.7%,感染级别也高于低剂量组,但高剂量组和中剂量组的感染率均低于死亡率,且有较大的差异。从表 2 可以看出,蝗虫微孢子虫对红胫戟纹蝗毒力测定的相关性高($r^2=0.961$), LD_{50} 为 1.7088×10^4 个孢子/头。3 个剂量处理组试虫的致死时间及其回归方程的分析结果表明,高剂量感染效果明显高于低剂量感染效果,高剂量组的半致死时间 LT_{50} 明显少于低剂量组,分别为 3.6 d 和 12.17 d,中剂量组的 LT_{50} 为 11.59 d。

2.3 蝗虫微孢子虫感染对红胫戟纹蝗呼吸代谢的影响

CO_2 释放率是指单位时间内昆虫个体的 CO_2 释放量,是衡量昆虫个体呼吸强弱的重要指标。实验结果表明,随着蝗虫微孢子虫孢子浓度的增加及感染时间的延长,试虫 CO_2 释放率与对照组相比显著降低($P < 0.05$)(图 1),表明在感染后期,蝗虫微孢子虫已明显影响了蝗虫的呼吸代谢。消耗率亦是衡量昆虫个体呼吸强弱的参数之一,图 2 结果表明,红胫戟纹蝗在感染微孢子虫后的初期和后期,耗氧率均没有发生显著变化。

表 1 不同剂量蝗虫微孢子虫对红胫戟纹蝗的致病性

Table 1 Pathogenicity of different doses *Nosema locustae* to *Dociostaurus kraussi kraussi* in indoor bioassay

感染剂量 (个/头) Doses (spores/ ind.)	供试虫数 (头) Quantity (ind.)	累计校正死亡率 (%) Cumulative corrected mortality(%)			感染率 (%) Infection rate (%)	不同感染级别试虫数 (头) Level of infection (ind.)		
		16 d	19 d	21 d		Level 1	Level 2	Level 3
6.5×10^3 (低剂量 Low dose)	60	5.00	6.26	11.11	30.0	18	0	0
6.5×10^4 (中剂量 Middle dose)	60	20.00	42.63	50.00	35.7	21	0	0
6.5×10^5 (高剂量 High dose)	60	65.00	68.42	72.22	41.7	10	8	7

表 2 蝗虫微孢子虫感染红胫戟纹蝗的毒力回归方程

Table 2 Regression equation of *Nosema locustae* to *Dociostaurus kraussi kraussi*

微孢子感染天数 (d) Days of postinfection (d)	毒力回归方程 Regression equation of toxicity	相关系数 (r^2) Correlation coefficient(r^2)	LD ₅₀ (95% 置信区间) LD ₅₀ (95% FL) (spores/ ind.)
21	$y=0.905x+1.1694$	0.98003	1.7088×10^4 (1.0789×10^4 - 2.7463×10^4)

表 3 不同剂量蝗虫微孢子虫感染红胫戟纹蝗的致死时间回归方程

Table 3 Lethal time linear regression equation of different doses *Nosema locustae* to *Dociostaurus kraussi kraussi*

感染剂量 (个/头) Doses (spores/ ind.)	致死时间回归方程 Regression equation of lethal time	相关系数 (r^2) Correlation coefficient(r^2)	LT ₅₀ (d)
6.5×10^3 (低剂量 Low dose)	$y=1.0183x-11.892$	0.8968	12.17
6.5×10^4 (中剂量 Middle dose)	$y=5x+57.457$	0.9206	11.59
6.5×10^5 (高剂量 High dose)	$y=0.012x+0.457$	0.9991	3.60

* 资助项目: 科技支疆项目 (201291136); 博士科研启动基金项目 (XJNUBS1216); 校级重点实验室招标课题

**E-mail: huhongxia111@126.com

***通讯作者, E-mail: jirong@xjnu.edu.cn

收稿日期: 2013-08-12, 接受日期: 2013-12-04

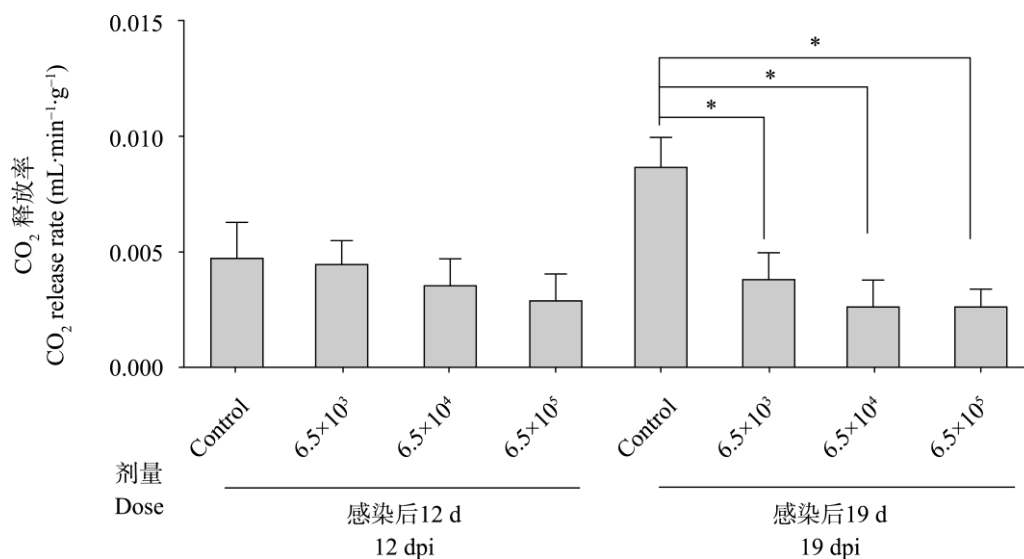


图 1 不同剂量蝗虫微孢子虫感染红胫戟纹蝗的 CO₂ 释放率

Fig. 1 CO₂ release rate of different doses of *Nosema locustae* infected *Dociostaurus kraussi kraussi*

数据表示平均值±标准差。*表示经 *t*-检验差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

Data are mean±SD. * indicates significant difference at 0.05 level by *t* test. dpi: Days of post inoculation. The same below.

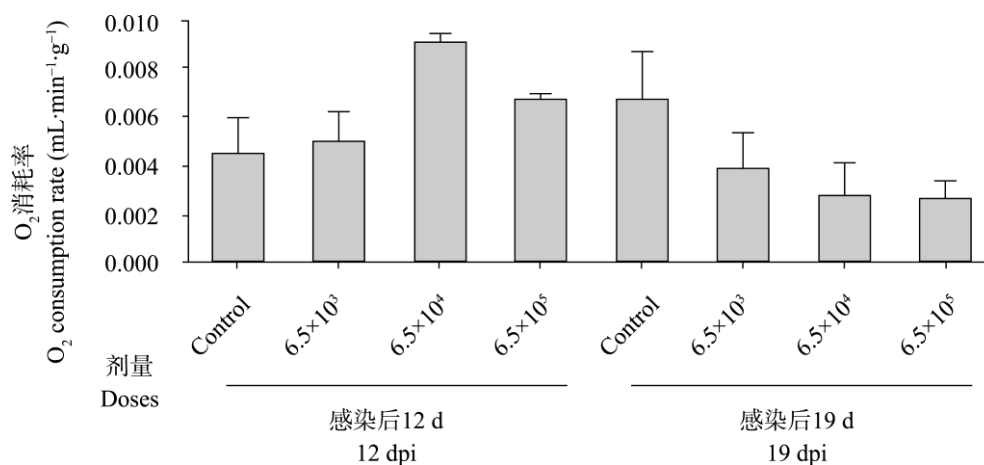


图 2 不同剂量蝗虫微孢子虫感染红胫戟纹蝗的耗氧率

Fig. 2 O₂ consumption rate of different doses of *Nosema locustae* infected *Dociostaurus kraussi kraussi*

3 讨论

目前新疆治理蝗灾主要依赖于以化学方法降低蝗虫种群密度。化学防治有其快速、高效等优点,但长期反复使用化学杀虫剂不仅造成蝗虫产生抗药性、防治成本增加、牲畜中毒频发和环境污染加重等系列问题,而且导致蝗虫天敌种类

和数量减少,削弱了天敌对蝗虫种群数量的自然控制作用。面对“蝗灾暴发-化学防治-蝗灾加剧”的恶性循环,如何持续、安全、低成本控制蝗灾,积极探索寻找有效的生物治蝗技术,不仅是当前国内外蝗灾综合治理的发展趋势,也是恢复新疆草地生态系统平衡和实现新疆畜牧业可持续发展亟待解决的关键问题。利用蝗虫微孢子虫治理

蝗虫是国内外发展最快、应用最广泛的一项技术 (Solter *et al.*, 2012)。

目前东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* 是国内用于生产蝗虫微孢子虫的活体增殖寄主, 但由于东亚飞蝗在新疆没有自然分布区, 因此从新疆本地优势蝗虫种类中筛选出具有应用潜力的蝗虫微孢子活体增殖寄主就成为关键。本研究通过室内接种逐头喂食的方法, 结果表明, 蝗虫微孢子虫对新疆优势蝗虫种类红胫戟纹蝗有较强的致病力, 高剂量组的死亡率超过 70%, 可以推断红胫戟纹蝗可以作为蝗虫微孢子在新疆本地的潜在活体繁殖寄主。

而且本研究所采用逐头喂食的接种方法, 与传统的夹毒叶片法相比 (Huang and Solter, 2013), 更能确保试虫摄入微孢子虫的准确剂量。

本文实验结果表明, 高剂量组和中剂量组的感染率均低于死亡率, 且具有较大的差异。分析原因可能与本文采用的微孢子虫检测方法的敏感度较低有关, 导致一些试虫虽已经感染了微孢子虫但并未被检测出来。因此, 研究出一种更加灵敏的微孢子虫检测方法也是非常必要的工作。

呼吸代谢是昆虫生命特征之一, 任何外界因素都会影响昆虫的呼吸代谢 (戈峰, 1991)。在正常情况下, 昆虫释放 CO_2 的速率要低于 O_2 进入的速率, 这会导致昆虫体内 CO_2 浓度的增加, 后引起昆虫气门开放以排除蓄积的 CO_2 (Hetz and Bradley, 2005)。我们对感染微孢子的红胫戟纹蝗进行了呼吸代谢的研究, 本本文结果表明, 微孢子虫感染后, 蝗虫 CO_2 释放量明显降低, 分析其原因如下, 其一, 微孢子侵入昆虫体内, 使昆虫正常的生理代谢受到影响, 抑制了与呼吸代谢相关酶的作用; 其二, 蝗虫微孢子虫对蝗虫气门的开闭可能起到了阻碍作用, 导致 CO_2 释放

量降低。耗氧量则在感染前后无显著差异, 具体原因尚不清楚。本文的研究结果有助于进一步深入探讨微孢子虫的感染机制。

参考文献 (References)

- Bigliardi E, Sacchi L, 2001. Cell biology and invasion of the microsporidia. *Microbes Infect.*, 3(5): 373–379.
- Hetz SK, Bradley TJ, 2005. Insects breathe discontinuously to avoid oxygen toxicity. *Nature*, 433(7025): 516–519.
- Henry JE, 1971. Experimental application of *Nosema locustae* for control of grasshoppers. *J. Invertebr. Pathol.*, 18(3): 389–394.
- Huang WF, Solter LF, 2013. Comparative development and tissue tropism of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 113(1): 35–41.
- Lange CE, Azzaro FG, 2008. New case of long-term persistence of *Paranosema locustae* (Microsporidia) in melanopline grasshoppers (Orthoptera: Acrididae: Melanoplinae) of Argentina. *J. Invertebr. Pathol.*, 99(3): 357–359.
- Plischuk S, Bardi CJ, Lange CE, 2013. Spore loads of *Paranosema locustae* (Microsporidia) in heavily infected grasshoppers (Orthoptera: Acridoidea) of the Argentine Pampas and Patagonia. *J. Invertebr. Pathol.*, 114(1): 89–91.
- Solter LF, Becnel JJ, Oi DH, 2012. Microsporidian Entomopathogens. Insect Pathology. Academic Press, Elsevier Inc. 221–262.
- 丁晓宇, 张龙, 2009. 蝗虫微孢子虫与绿僵菌协调使用对东亚飞蝗的毒力测定. 北京农学院学报, 24(1): 9–14. [DING XY, ZHANG L, 2009. Virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Nosema locustae* against the nymphs of *Locusta migratoria manilensis*. *Journal of Beijing University of Agriculture*, 24(1): 9–14.]
- 戈峰, 1991. 影响昆虫呼吸代谢的因素. 昆虫知识, 28(5): 319–321. [GE F, ZHANG L, 2009. Effect factors of the respiration and metabolism of insects. *Entomological Knowledge*, 28(5): 319–321.]
- 巩爱岐, 刘晓健, 蒋湘, 张龙, 2003. 蝗虫微孢子虫疾病在青海草原蝗虫种群中的传播. 中国生物防治, 19(3): 118–121. [GONG AQ, LIU XJ, JIANG X, ZHANG L, 2003. *Locusts microspore* disease spread in Qinghai grassland locust populations. *Chinese Journal of Biological Control*, 19(3): 118–121.]
- 李鹏, 石旺鹏, 严毓骅, 2006. 蝗虫微孢子虫对海南省蝗区飞蝗和土蝗的协同控制作用. 昆明: 中国植物保护学会 2006 学术年会. 407–410. [LI P, SHI WP, YAN YH, 2006. Coordination controlling of *Locusts microspore* for migratory locust and

- grasshoppers in Hannan province. Kunming: China Society of Plant Protection 2006 Academic Annual Conference: 407-410.]
- 王丽英, 严毓骅, 董雁军, 林志亮, 1987. 蝗虫微孢子虫对东亚飞蝗及蒙、新草原蝗虫的感染试验. 北京农业大学学报, 13(4): 459-462. [WANG LY, YAN YH, DONG YJ, LIN ZL, 1987. Observations of a microsporidian parasite *Nosema locustae* canning in the oriental migratory locust (*Locusta migratoria manilensis* (Meyen)) and other hosts from inner Mongolia and Xinjian. *ACTA Agriculturae Universitatis Pekinensis*, 13(4): 459-462.]
- 王丽英, 严毓骅, 管致和, 1990. 蝗虫微孢子虫对东亚飞蝗的实验感染. 昆虫学报, 33(1): 121-123. [WANG LY, YAN YH, GUAN ZH, 1990. Experimental in fection of *Nosema locustae* canning in the oriental migratory locust (*Locusta migratoria manilensis* (meyen)). *ACTA Entomologica Sinica*, 33(1): 121-123.]
- 王丽英, 曹春, 余晓光, 阿不都 外力, 杨昶旭, 1994. 微孢子虫饵剂的不同配方对新疆草原蝗虫的防治效果. 生物防治通报, 10(3): 28-30. [WANG LY, CAO C, YU XG, ABUDU WL, YANG CX, 1994. Effects of the control of grasshoppers in Xinjiang rangeland by using *Nosema locustae* bran bait with different formulation. *Chinese Journal of Biological Control*, 10(3): 28-30.]
- 张龙, 严毓骅, 2008. 以生物防治为主的蝗灾可持续治理新对策及其配套技术体系. 中国农业大学学报, 13(3): 1-6. [ZHANG L, YAN YH, 2008. New strategies and technical systems for sustainable management of locust and grasshopper mainly based on biocontrol. *Journal of China Agricultural University*, 13(3): 1-6.]