

# 斜纹夜蛾微孢子虫在昆虫细胞系的体外培养\*

谢伟东

(昆虫学研究所)

## 摘 要

以受斜纹夜蛾微孢子虫(*Nosema* sp.)感染的斜纹夜蛾幼虫血淋巴感染草地贪夜蛾传代细胞系,建立了感染斜纹夜蛾微孢子虫的体外传代细胞。以这种体外细胞培养试验证明,斜纹夜蛾微孢子虫不能在37°C下发育,最适发育温度为25°C。用光学显微镜及电子显微镜的研究证明,斜纹夜蛾微孢子虫整个生活周期都以一对双核存在,母孢子以二分形成两个孢子母细胞,孢子具有一对双核的孢质、极管及极质体;极管为12~13圈,为典型的微孢子属。

**关键词** 斜纹夜蛾, 微孢子虫, 昆虫传代细胞, 体外培养, 温度, 发育

自然界中,微孢子虫在调节控制昆虫种群中起着重要的作用。由于微孢子虫是专性寄生的,只能在寄主细胞内繁殖;因此,利用体外培养细胞,系统研究微孢子虫的发育、生理及生化等问题具有特殊意义。现已有几种昆虫微孢子虫在体外细胞系中繁殖的报道<sup>[1-7]</sup>,但都以诱发孢子在体外放出极管、建立感染。本研究在前人的基础上,对其感染方法进行了改进,成功地将斜纹夜蛾微孢子虫感染了草地贪夜蛾传代细胞系,并对这种微孢子虫的生活周期及温度对其的影响作了详细的研究。

## 1 材料与方 法

**1.1 细胞株** 试验用草地贪夜蛾传代细胞株IPL-21,引自英国环境保护委员会病毒研究所(NERC, Institute of Virology, Oxford, England),细胞培养液为TC-100(GIBCO),补加10%胎牛血清,青霉素100单位/毫升和链霉素100毫克/毫升。传代细胞在25°C下培养,每5~6天传代一次。

本文1987年4月收到

● 本研究部分实验在英国伦敦帝国理工学院生物系Canning教授指导下完成,谨此致谢。

**1.2 病原物** 斜纹夜蛾微孢子虫由本实验室采集和分离。将严重感染的斜纹夜蛾幼虫捣碎、匀浆和经4层尼龙纱布过滤后,再经差速离心(分别为150rpm/分10分钟,3000rpm/分10分钟),重复三次。收集的孢子可贮存于4℃下,以备使用。感染一般以三龄幼虫,每条幼虫用 $2 \times 10^6$ 个孢子。

**1.3 感染传代细胞的建立及维持** 已受微孢子虫感染的10~15天左右的斜纹夜蛾,经70%乙醇表面消毒5分钟后,刺破幼虫一腹足,让血淋巴滴入已有草地贪夜蛾传代细胞的平底小试管中,经1200转/分离心5分钟,培养24小时后,将受感染细胞接到25cm<sup>2</sup>的细胞培养瓶中继续培养。每隔6~7天,正常细胞与感染细胞以5:1的比例混合维持感染微孢子虫细胞的传代。

**1.4 温度影响** 测定不同温度对微孢子虫发育及感染的影响。正常细胞与感染细胞以5:1混合。以每孔 $2 \times 10^5$ 细胞置于24孔细胞培养板中。分别将细胞板置于20℃,25℃,30℃,37℃中培养。每隔2天每一试验温度组合取3孔,经固定染色后,在光学显微镜下,每样品分别检查200个细胞的感染率、微孢子虫总数。

**1.5 光学显微镜** 以100%甲醇固定细胞,用10%吉姆沙染色液染色,在光学显微镜下观察。

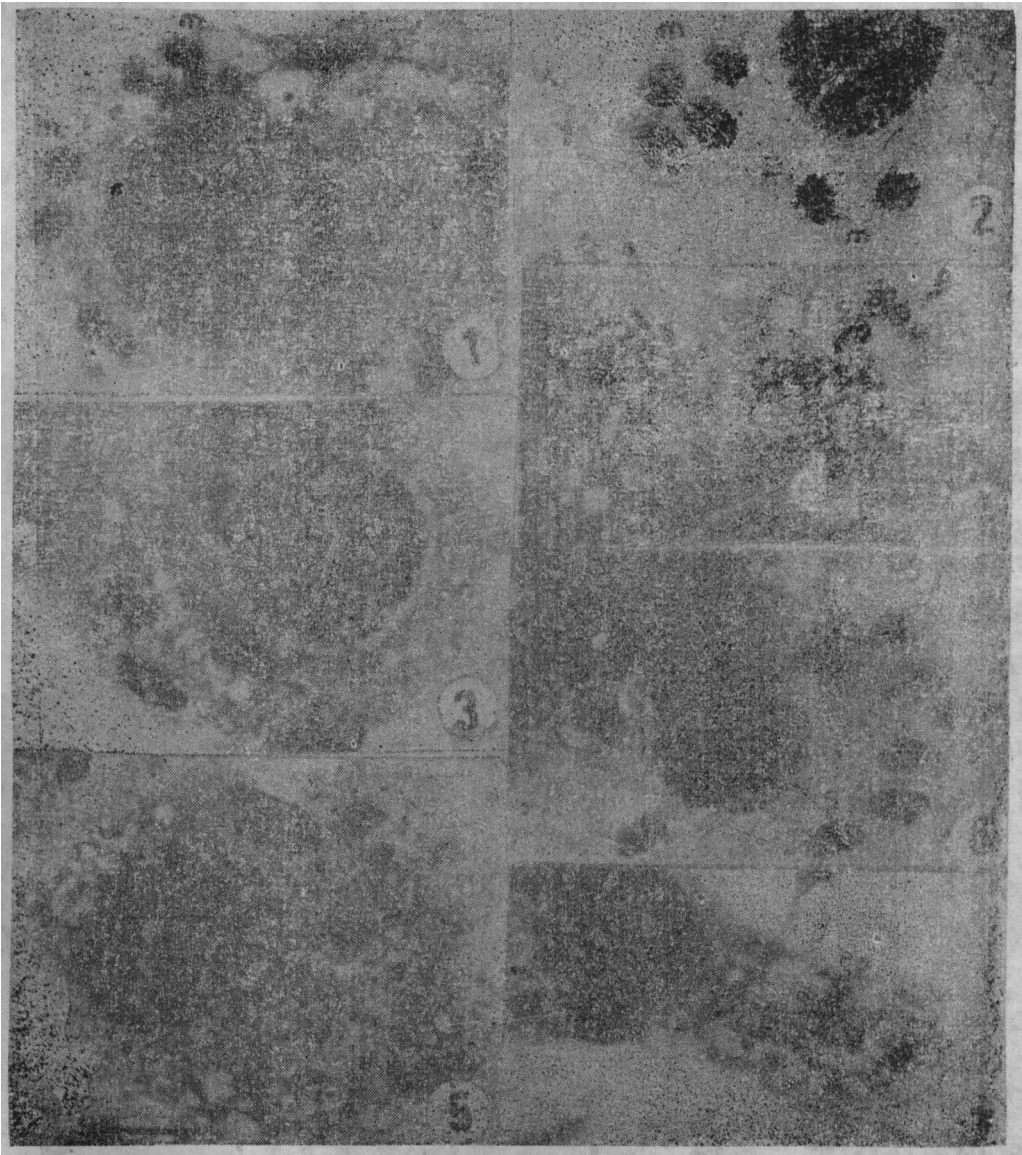
**1.6 电子显微镜** 样品以Karnovsk's固定液(内含5%戊二醛,2%多聚甲醛,0.2M二甲胍酸钠缓冲液)作单层细胞原位前固定,以2.5%锇酸后固定,经一系列常规脱水,最后包埋于Spurr's包埋剂,作超薄切片;切片经1%醋酸铀和1%柠檬酸铅染色后,在飞利浦EM300电镜下观察。

## 2 结果

**2.1 光学显微镜观察** 以严重感染的昆虫血淋巴感染草地贪夜蛾细胞系,14天后就可观察到斜纹夜蛾微孢子虫在细胞内形成孢子。受感染的昆虫血细胞一般在14天后自行解体消失,而微孢子虫继续侵染传代细胞。此受感染细胞系培养于25℃,维持了两年以上。由此观察到斜纹夜蛾微孢子虫的整个生活周期。斜纹夜蛾微孢子虫的裂殖体早期在寄主细胞内呈圆形,为 $2.6 \pm 0.3$ 微米,其细胞核与细胞质着色较深,但可辨别出双核排列;分裂时,这对双核分别移向两极并分裂,接着,细胞质收缩并缢裂(图版I—1,2)。大多数裂殖体和母孢子呈双核,但在光学显微镜下区别两者较为困难。一般圆形的、细胞质着色较浅的为裂殖体;体形纺锤形、细胞质着色较深的为母孢子(图版I—3,4,5,6)。裂殖体经约4~5次二分裂后,发育成母孢子;母孢子以二分裂形成一对孢子母细胞;最后,由此发育为孢子。其孢子大小为 $5.9 \pm 0.5 \times 2.7 \pm 0.35$ 微米,孢子呈卵形(图版I—7)。

**2.2 电子显微镜观察** 电镜中裂殖体具一层简单的细胞膜,直接与寄主细胞质接触,呈双核排列(图版II—8),其双核紧密相贴,但并不融合,各自有核膜包围(图版II—9)。进入孢子形成期,以一层电子致密层分泌到细胞膜上为标志,并具有多层的内质网围着细胞核(图版II—10,11,12),成熟的孢子壁可见二层,较薄的电子致密层为孢子外壳(EX);较厚的电子透明层为孢子内壳(EN);一对双核位于孢子后部,

极管(PT)盘卷,为12~13圈,极质体可辨认出位于孢子前部(图版Ⅰ—13)。



图版 I

4—7. 斜纹夜蛾微孢子虫在草地贪夜蛾传代细胞中的各生活期 标尺=10 $\mu$ m

1—7. Development of *Nosema* sp. from *Spodoptera frugiperda* cell cultures.

Scale bar=10 $\mu$ m

1,2. 裂殖体早期(m), 呈圆形或椭圆形并具有一对双核

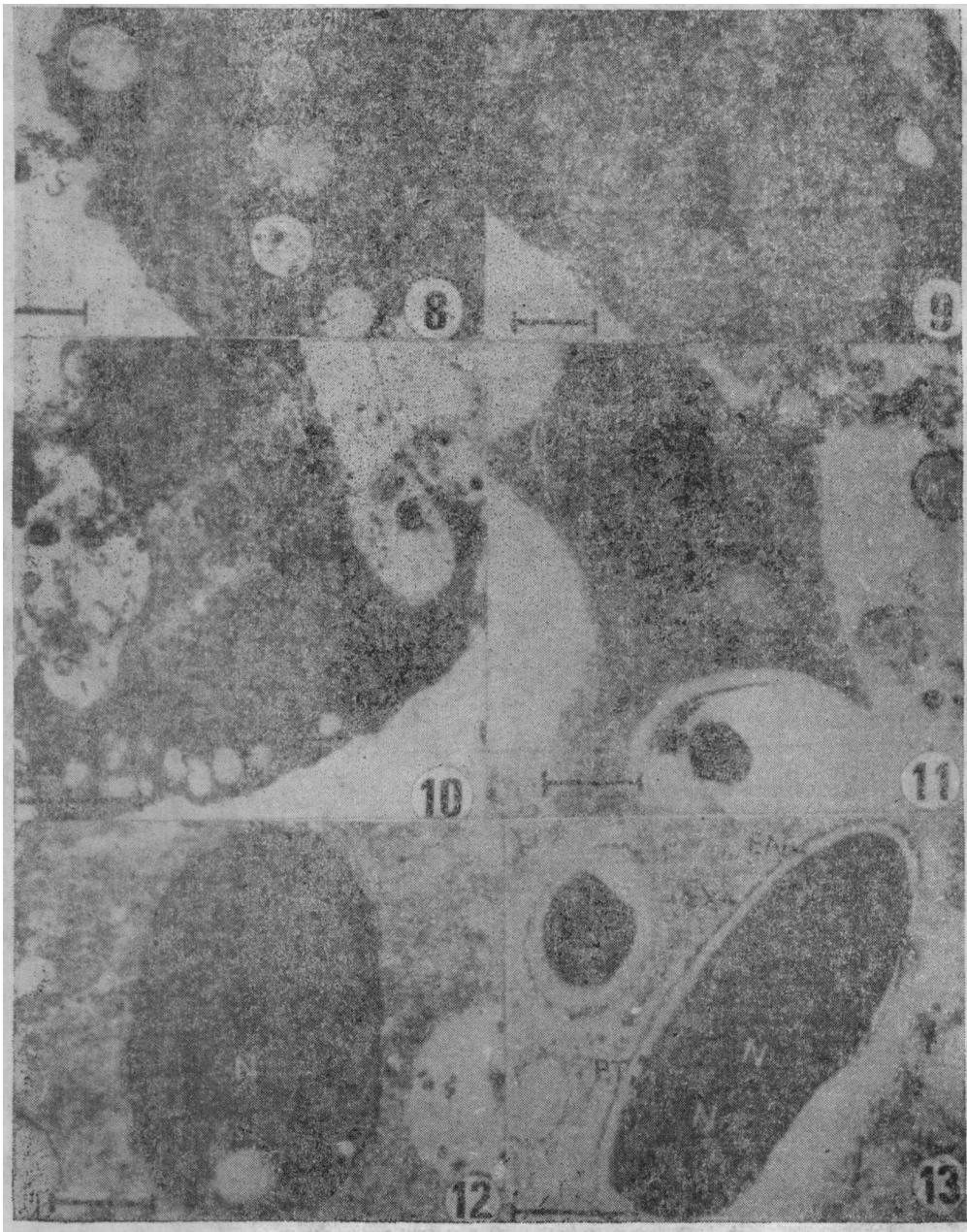
1,2. Meronts(m), rounded or ovoid with diplokaryon nuclei

3—6. 母孢子(S), 纺锤形的母孢子具双核, 图4中显示母孢子在分裂(箭头所示)

3—6. Sporont (S), spindle-shaped with central diplokarya; dividing sporont arrowed in Fig. 4

7. 严重感染的细胞具有孢子及孢子母细胞(sp)

7. A heavily infected cell with numerous spores and sporoblasts(sp)



图版 I

8—13. 斜纹夜蛾微孢子虫各生活期的超微结构, 标尺 $1\mu\text{m}$

8—13. Electron micrographs of stages of *Nosema* sp. from *S. litura* in *S. frugiperda* cell cultures. Scale bar =  $1\mu\text{m}$

8,9. 具双核的长型的裂殖体。

8,9. Elongate meronts with 2 nuclei (N) in diplokaryon arrangement.

10,11. 母孢子细胞膜具有较厚的电子致密层; 为双核(N)结构; 细胞质中内质网成规则排列

- 10,11. A sporont, with 2 nuclei (N) in diplokaryon arrangement, has a thick plasmalemma and the cytoplasm contains endoplasmic reticulum in regular arrangement;
12. 具双核的孢子母细胞。孢膜继续加厚, 具有内质网和丰富的核糖体。  
12. Sporoblast, one of 2 nuclei (N) is visible; there is an electron surface dense coat and concentrically arranged rough endoplasmic reticulum
13. 成熟孢子具有一对双核(N)、极管(PT)、极质体(PP), 孢壳可见孢外壳(EX)与孢内壳(EN)。  
13. A mature spore with a diplokaryon nucleus, closely-packed membranes of polaroplast and coiled polar tube. (PT: Polar tube, EX: Exspore, EN: Endospore)

**2.3 不同温度对微孢子虫发育的影响** 将受斜纹夜蛾微孢子虫感染的草地贪夜蛾细胞置于20℃、25℃、30℃、37℃下培养。在37℃下, 发现斜纹夜蛾微孢子虫不能发育; 30℃下, 初始细胞感染率为17%, 在4天后, 受感染的细胞最多达39%, 经10天培养减少到19%; 20℃下培养4天后, 细胞的感染率达到近20%, 随后10天的培养, 维持在这一水平中; 25℃下培养4天后, 感染率迅速增加, 第6天感染率为45%。后三种温度中, 斜纹夜蛾微孢子虫的感染率在第8和第10天是显著不同的( $P < 0.05$ )(图1a)。

微孢子虫的生长曲线在20℃与25℃下是相似的。在25℃下培养的第2天和20℃下培养的第4天后, 斜纹夜蛾微孢子虫一直处于对数生长; 第10天, 平均每200个细胞分别有1400和1200个微孢子虫。而在30℃下, 斜纹夜蛾微孢子虫生长缓慢, 200个细胞中的微孢子虫数仅为上述两种培养温度的二分之一(图1b)。

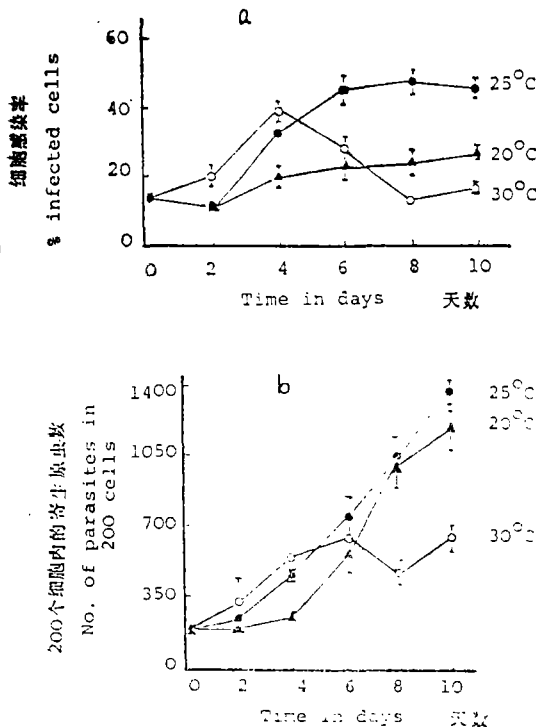


图1 三种温度(20℃、25℃、30℃)对斜纹夜蛾微孢子虫发育的影响

Fig.1 The effect of temperature on the growth of *Nosema* sp. from *S. litura* in *S. frugiperda* cell cultures, when incubated at 20°C, 25°C and 30°C.

a. 斜纹夜蛾微孢子虫的细胞感染率

b. 各温度下(20℃、25℃、30℃), 每200个寄主细胞内的寄生原虫总数

a. The percentage of cells infected with *Nosema* sp. when incubated at 20°C, 25°C and 30°C.

b. The number of parasites (vegetative stages and spores) per 200 cell when cultures were incubated at 20°C, 25°C and 30°C.

### 3 讨论

虽然已有几种昆虫微孢子虫在体外培养细胞中建立了感染<sup>[1-7]</sup>。但是,感染需要一定的条件才能建立:①必须制备出高度纯化并无菌的孢子;②能在体外的条件下,使孢子放出极管,让其极质(Sporoplasm)刺入寄主细胞质内。因此,至今已建立微孢子虫体外培养仍属稀少。本研究用感染了斜纹夜蛾微孢子虫的昆虫血淋巴成功地感染了草地贪夜蛾传代细胞株;并且,以相似的方法也成功地建立了另外4种昆虫微孢子虫的体外培养(另文发表);证明了这一方法是简单和可靠的,要建立其它昆虫或无脊椎动物微孢子虫的体外培养系统也可应用同样方法。

除了脑孢子虫*Encephalitozoon cuniculi*<sup>[7]</sup>,一般微孢子虫是只能在低于37℃下发育。已报道家蚕微孢子虫*Nosema bombycis*、按蚊微孢子虫*Nosema algerae*都不能在37℃下发育,本实验也证明了斜纹夜蛾微孢子虫*Nosema sp.*有同样结果。这些结果说明,由于温度提供了自然屏障,感染冷血动物的微孢子虫不可能感染温血动物。37℃以下,斜纹夜蛾微孢子虫的最适发育温度为25℃;在30℃,发育受到抑制。

Cali<sup>[6]</sup>利用电镜观察了微孢子属(*Nosema*)的模式种家蚕微孢子虫*Nosema bombycis*,证明了这个属的整个生活史较为简单,生活史中各生活期的原虫均为双核结构,并且母孢子经分裂形成一对孢子母细胞。本实验也证明了斜纹夜蛾微孢子虫为双核结构,母孢子也经分裂形成一对孢子母细胞,因此分类上应属于微孢子属。Watanabe<sup>[8]</sup>曾报道用斜纹夜蛾微孢子虫喂食家蚕而未发现感染,证实了这种微孢子虫不是家蚕微孢子虫。由于这种微孢子虫的寄主较为广泛,已证实可感染6种以上鳞翅目昆虫<sup>[8]</sup>。因此,要对此种微孢子虫进行种的鉴定,除了需要比较孢子的超微结构、寄主范围、寄主部位等外,还需借助现代生化及免疫技术等方法来鉴别。

### 参 考 文 献

- [1] Ishihara, R. and S.S.Sohi., *J. Invertebr. Pathol.*, 8(1966), 538-540.
- [2] Kurtti, T. J. and M. A. Brooks, *J. Invertebr. Pathol.* 29(1977), 126-132.
- [3] Undeen, A. H., *J. Protozool.*, 22(1975), 107-110.
- [4] Streett, D. A., D. Ralph, and W.F. Hink, *J. Protozool.*, 27(1980), 113-117.
- [5] Kawarabata, T. and R. Ishihara, *J. Invertebr. Pathol.*, 44(1984), 52-62.
- [6] Cali, A., *Proceeding IVth International Colloquim on Insect Pathology*, Univ. of Maryland Press College Park(1971), pp. 431-438.
- [7] Waller, T., *Lab. Animal.*, 9(1975), 61-68.
- [8] Watanabe, H., *J. Invertebr. Pathol.*, 28(1976), 321-328.

## Development of *Nosema* sp. from *Spodoptera litura* in A Insect Cell Line

*Xie Weidong*

### Abstract

*Nosema* sp., a microsporidia parasite of cotton leafworm *Spodoptera litura* was successfully established in *Spodoptera frugiperda* cell cultures by addition of haemolymph from larvae infected with the microsporidia. The most favourable temperature for growth of *Nosema* sp. was 25 °C, but they failed to develop at 37 °C. Light and electron microscopy were used to observe the development of *Nosema* sp. and showed that nuclei in all stages are in diplokaryon arrangement. A sporont divided into two sporoblasts by binary fission. The spore nuclei were situated in posterior half of the spore within 12-13 coils of the polar tube.

**Keywords:** *Spodoptera litura*, microsporidia, insect cell line, in vitro culture, temperature, development