



【Research report】

斜紋夜蛾微孢子蟲Noesma sp. 孢子超微構造之究【研究報告】

徐泰浩、徐爾烈、嚴奉琰

*通訊作者E-mail:

Received: Accepted: 1991/10/14 Available online: 1991/09/01

Abstract

摘要

斜紋夜蛾(*Spodoptera litura*)之病原微生物—微孢子蟲*Nosma* sp.—為台灣之新記錄種。目前此類微生物種類的鑑定，主要以其超微構造為依據，尤其是此類寄生蟲之胞器—極絲(polar filament)，其在孢子內所纏繞之圈數和極圈連線與孢子縱軸所形成之傾斜角，一直為許多研究者在分類與鑑定上採用為分類標準。本研究所提供之證據顯示，上述標準會因切片之角度或孢子本身發育期而有所差異。孢子內胞器除極絲外，尚可見雙倍體核(diplokaryon)與空泡(posterior vacuole)，細胞質中密佈核糖體(ribosome)並可形成細胞質溝(cytoplasmic groove)，極絲是由孢子前端極帽(polar cap)所連接之垂管(manubrium)穿越極質(polaroplasm)所延伸。極質可分為二部份：前部份為鰓葉層區(laminar region)，後部分為囊膜系區(saccute membrous systemregion)。此研究結果可提供本微孢子蟲在分類鑑定上的參考。

Key words:

關鍵詞: 斜紋夜蛾、微孢子蟲、孢子、超微構造、鑑定、*Nosema* sp.。

Full Text: [PDF\(12.61 MB\)](#)

下載其它卷期全文 Browse all articles in archive: <http://entsocjournal.yabee.com.tw>

斜紋夜蛾微孢子蟲 *Noesma* sp.孢子 超微構造之研究

徐泰浩 大葉工學院食工系 彰化縣大村鄉山腳路112號

徐爾烈 國立台灣大學植物病蟲害學系 台北市羅斯路四段1號

嚴奉琰 國立台灣大學植物病蟲害學系 台北市羅斯路四段1號

摘要

斜紋夜蛾(*Spodoptera litura*)之病原微生物——微孢子蟲*Nosema* sp.——為台灣之新記錄種。目前此類微生物種類的鑑定，主要以其超微構造為依據，尤其是此類寄生蟲之胞器——極絲(polar filament)，其在孢子內所纏繞之圈數和極圈連線與孢子縱軸所形成之傾斜角，一直為許多研究者在分類與鑑定上採用為分類標準。本研究所提供之證據顯示，上述標準會因切片之角度或孢子本身發育期而有所差異。孢子內胞器除極絲外，尚可見雙倍體核(diplokaryon)與後空泡(posterior vacuole)，細胞質中密佈核糖體(ribosome)並可形成細胞質溝(cytoplasmic groove)，極絲是由孢子前端極帽(polar cap)所連接之垂管(manubrium)穿越極質(polaroplasm)所延伸。極質可分為二部份：前部份為鰓葉層區(laminar region)，後部份為囊膜系區(saccute membrous system region)。此研究結果可提供本微孢子蟲在分類鑑定上的參考。

關鍵詞：斜紋夜蛾、微孢子蟲、孢子、超微構造、鑑定、*Nosema* sp.。

Spore Ultrastructure of a Microsporidian Species (*Nosema* sp.) from the Tobacco Cutworm *Spodoptera litura*

Tai-Hao Hsu Department of Food Engineering, Dai-Yeh Institute of Technology, Tatsun, Changhua, Taiwan, R.O.C.

Err-Lieh Hsu Department of Plant Pathology and Entomology, National Taiwan University, 1 Roosevelt Road, Sec. VI., Taipei, Taiwan, R.O.C.

David F. Yen Department of Plant Pathology and Entomology, National Taiwan University, 1 Roosevelt Road, Sec. VI., Taipei, Taiwan, R.O.C.

ABSTRACT

Spore ultrastructure of a newly recorded microsporidian species *Nosema* sp., isolated from the tobacco cutworm *Spodoptera litura* in Taiwan, was studied. Evidences showed that the turns and the coiling tilt of the polar filament of the spore generally served as important criteria for classification and identification were not suitable because appearances of polar filament in different sections and different developmental stages varied. Within the spore, well-organized rows of ribosomes were arranged around the diplokaryon and formed a cytoplasmic groove. The apical anchoring disc, polar cap, overlaid the manubrium of the polar filament, two regions of the polaroplasm could be distinguished: the anterior part was laminar region and the posterior was saccute membrane system region. A posterior vacuole was found at the posterior pole of the spore. The result of this study provides advanced information for classification and identification of this spore.

Key words: Spore ultrastructure, microsporidia, *Nosema*, *Spodoptera litura*, identification.

前　　言

斜紋夜蛾(*Spodoptera litura*)屬於鱗翅目(Lepidoptera)夜蛾科(Noctuidae)，一向為本省重要之經濟害蟲。其蟲生性病原微生物之新記錄種——微孢子蟲*Nosema* sp.(Microspora, Nosematidae)(徐，1984)具有降低寄主取食量、影響寄主生理潛勢之能力，應是一種理想之候選微生物劑。國外應用微孢子蟲，進行害蟲防治已有許多先例可循(Canning, 1982; Henry, 1981)，並有商品化之微

孢子蟲劑在美國註冊登記(Conlon, 1980)，應用在蝗蟲之防治上(Henry and Oma, 1981)。就一新記錄種而言，種名之鑑定是一非常基本而重要之工作。過去利用光學顯微鏡之方法，主要是以其孢子之大小與形狀，以及以Giemsa染色，觀察其生活史，做為種類鑑定之依據。就孢子之大小測定而言，可能因孢子之新鮮度(保存時間)、保存液之種類、處理方式(染色或未染色)，測量孢子之取樣數目、寄主種類、營養狀況、生理條件等而影響，因此以孢子大小當做微孢蟲種類分辨

之依據可能並不適當。

近年來從事於微孢子蟲種名之鑑定，主要係以其超微構造為依據(Larson, 1987, 1989, 1990; Toguebaye and Bouix, 1989)，尤其孢子本身可在活體外保存，不受寄主條件影響而變異，在超微構造比較上是一理想之材料。其內部胞器之一——極絲(polar filament)所形成之極圈數目與傾斜角度，被認為具有種類辨別之價值(Burges *et al.*, 1974; Sato *et al.* 1982)。本研究因此進行微孢子蟲*Nosema* sp.孢子超微構造之觀察，希望能提供一些種類鑑定上之依據。

材料與方法

(一) 斜紋夜蛾之飼養與感染

實驗室中累代飼育之斜紋夜蛾(*Spodoptera litura*)以人工飼料供食(小光及釜野，1976)，飼育於 $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 10\%$ 相對濕度之恆溫培養箱中。將純化冷凍保存之微孢子蟲(*Nosema* sp.)孢子懸浮液以每毫升濃度 10^7 孢子添加於人工飼料中(孢子懸浮液與人工飼料量比例為一毫升比十克重)，供飢餓24小時三齡斜紋夜盜幼蟲取食。經1~6日分別取樣，冷凍保存以進行超薄切片。

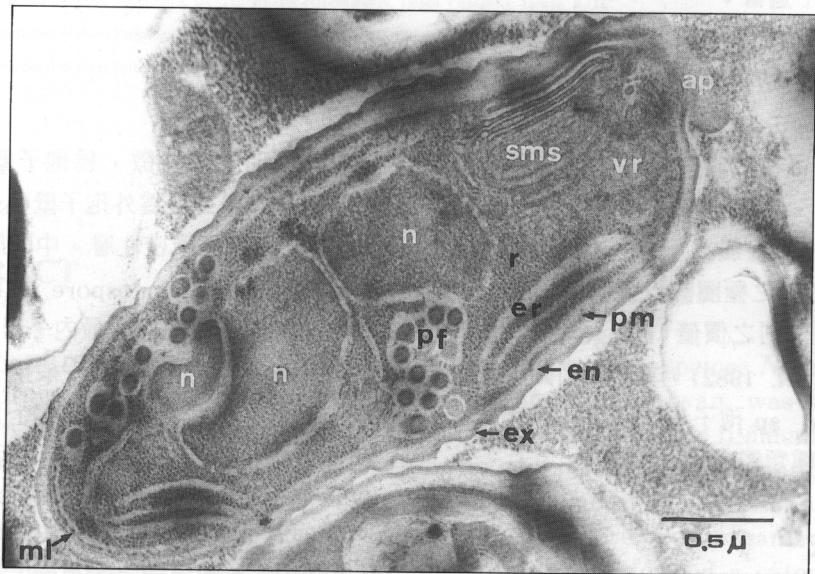
(二) 超薄切片與穿透式電子顎微鏡術

將保存之感病幼蟲樣品解凍後，以鑷子取出腸道立即置入2.5%戊二醛(glutaraldehyde)中固定，經12小時後以磷酸緩衝液(PBS, PH7.2)沖洗三次，再以2%鐵酸(osmium tetroxide)進行後固定。經二小時後再以PBS沖洗三次，經由丙酮系列脫水後，以Spurr's低黏度樹脂包埋，置於烘箱中加以聚合化。將樣品在Reichert-Jung Ultracut E超薄切片機上切片，切片以50%醋酸鈾(uranyl acetate)及2%檸檬酸鉛(lead citrate)染色。在JEOL-JM-100S 穿透式電子顎微鏡下

觀察及照像。

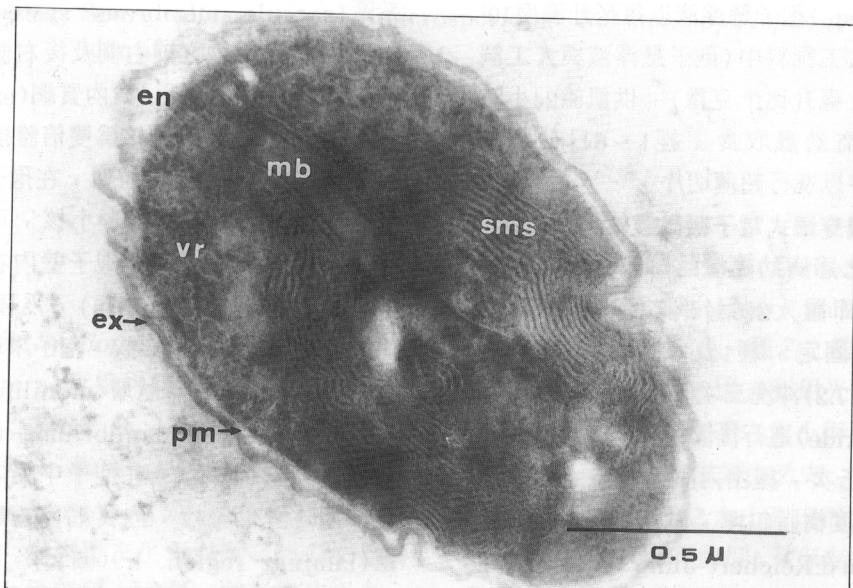
結 果

孢子時期之特徵，為孢子壁出現，其可分為三層，最外層為外孢子壁(exospore wall, ex)，為電子緻密性層。中間層為具電子透明性之內孢子壁(endospore wall, en)，隨孢子之成熟而逐漸增厚，最內一層為漿膜(plasma membrane, pm)。一般孢子呈卵圓形或長橢圓形，其內部胞器高度特化，呈現出多種之變化，或因切片角度，或因孢子年齡而異。圖一係孢子之縱切，其孢子長度為3.83um，寬度為1.67um，內孢子壁之厚度為0.067um，外孢子壁為不規則之波浪形。孢子之前端(ap)，雖略為模糊，但可見內孢子壁逐漸增厚，可能為極帽(polar cap, pc)融解所致。孢子內前端，約佔整個細胞四分之一區域為極質(polaroplast, pp)，極質可分為兩區：囊質區(vesicular region, vr)與囊膜系區(saccule membrous system region, sms)，於孢子內之前右側及後右側，可見三條狹長之電子透明區，為內質網(endoplasmic reticulum, er)。細胞核為雙倍體核(diplokaryon)，於孢子內前後並列，在孢子後半部之細胞核旁，可見另一腎形小核，可能為細胞核扭曲或懷疑為增生。孢子壁內在右兩側，各有11~12個極圈(coils)，為極絲(polar filament, pf)橫切所形成。孢子末端內孢子壁內側尚可見一層鏈珠狀層(moniliform layer, ml)。極絲之垂管(manubrium, mb)自囊膜系區中穿越(圖二)，在孢子中央之橫切，可見典型之雙倍體核、內質網、極絲及鰓葉層區(laminar region, lr)(圖三)。圖四為不同孢子前端之縱切，垂管前端與極帽接觸部分可見具有九個微孔之蓮蓬頭狀物，極質前部份為鰓葉狀之鰓葉層區，後半部為囊質區。



圖一 孢子前端(ap)為極質囊區(vr)及囊膜系(sms)，細胞核呈雙倍體核並可能存在增生核。極絲(pf)呈不規則聚集，孢子末端孢子壁內側具有念珠狀層(ml)，孢子壁可分內孢子壁(en)與外孢子壁(ex)，位於漿膜(pm)外。

Fig.1. Polaroplasm (pp) is consisted of vesicular region (vr) and saccate membrane system (sms) in the anterior part (ap), an suspect extra-nucleus presents beside diplakargon. The aggregation of polar filament (pf) is seen in cytoplasm, a moniliform layer (ml) inside the end pole and a spore wall composed of exospore (ex) and endospore wall (en).



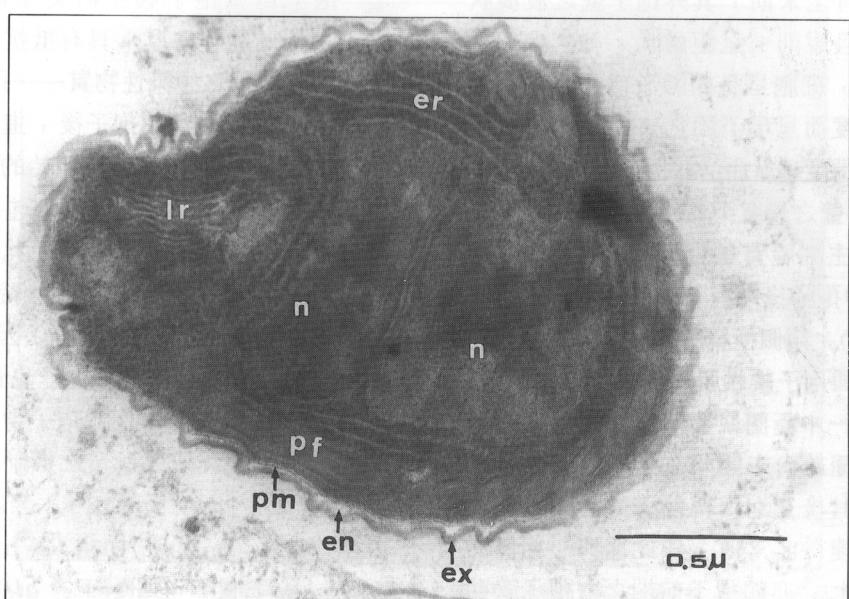
圖二 孢子前端之斜切面可見極絲之垂管穿越過囊膜系(sms)。

Fig.2. The oblique section showing manubrium (mb) of polar filament passes through saccate membrane system (sms).

孢子發育至末期，其外孢子壁之波浪狀起伏較緩和且規則，呈鉅齒狀，且其內孢子壁顯著增厚，細胞呈長橢圓形或長卵圓形，因切片之角度而呈現不同之大小。本研究中所見之最大長度為4.19um，最大寬度為2.10 um。內孢子壁之最寬平均厚度為146um。細胞經常與寄主細胞質呈分離狀態(圖六、圖七)。圖五中孢子後端有一後空泡(posterior vacuole, pv)，兩側極絲所形成之極圈各為13個，其聯線與孢子縱軸所形成之傾斜角為37-40度。與圖一中極圈聚集情形比較，可知薄壁孢子期其極絲尚未開始在孢子內纏繞。在圖六中可見其後空泡度得較小，而孢子前端之內孢子壁變得非常薄，與此種情形相反的是圖五與圖七，亦即孢子前端之內孢子壁明顯增厚。而後空泡也較大，甚至如圖七之後空泡已呈空化狀。此點可能與孢子之萌發(germination)有密切關係，亦即孢子萌發時，會將孢子內之極絲彈出，此極絲之長度為孢子長度之20~40倍(徐，1984)，後空泡可提供其彈力之來源，故當孢子前端孢子壁變薄時，後空泡同時也壓縮變小，以使極絲彈出。圖六中兩側極圈數達16~17個，與孢子縱軸之傾斜角為76度。圖七中兩側之極圈數為10~11個，且其雙倍體核呈左右並列且極質位置空化，其旁側有一雙層膜質包住之顆粒性胞器(短箭頭所指)，此種胞器在過去之文獻中未曾被描述過。圖八中之孢子，則可見其細胞質溝(cytoplasmic groove, cg)擴大化且孢子前端鈍圓、後端尖削，與多數孢子前端尖削、後端鈍圓之情形相反(如圖六)，極帽部份(pc)亦相當明顯；雖然圖中所見之細胞核為單核，而由其它孢子之雙倍體核而言，此單核情形應為切片角度差異所致，細胞質中密佈許多核糖體(ribosomes, r)。

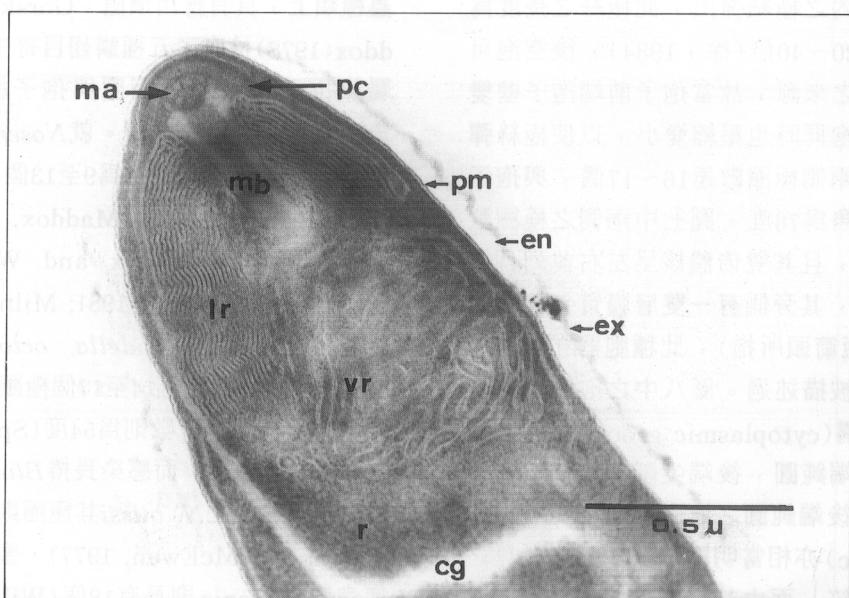
討 論

孢子為微孢子蟲生活史中最後一個階段，其孢子壁非常厚，具有抵抗不良環境之功能，而孢內之感染性物質——孢質(sporoplasm)，當其被釋出孢子後，進入寄主細胞中即是由裂殖體(meront)開始的另一個生活史。就孢子內胞器特化而言，包括極帽、極質、極絲之盤繞，充分說明了此類生物之特徵。孢子發育初期，其超微構造與子囊孢子(sporoblast)比較容易區分，因為具有內孢子壁之形成。極絲是微孢子蟲最重要之特徵；當環境發生改變時，孢子會將體內之極絲伸出，但此種孢子萌發之機制，不論在活體內或活體外，均受到許多因素之影響(Undeen and Epsky, 1990, Whitlock and Johnson, 1990)。Burges *et al.* (1974)最早提出，孢子內極圈之數目及其與孢子縱軸之傾斜角，具有分類上之價值。Sato *et al.* (1982)也認為極圈之傾斜度，在分辨微孢子蟲種類上，具有應用價值。Gorske and Maddox(1978)檢查了五種鱗翅目寄主之*Nosema*屬微孢子蟲，發現極圈與孢子縱軸之傾斜角，都在40度至50度間。就*Nosema*屬微孢子蟲而言，其極圈之數目為9至13個(Colley *et al.*, 1975; Gorske and Maddox, 1978; Kline *et al.*, 1985; Maddox and Webb, 1983; Malone and Wigley, 1981; Milner, 1972)，但發生在水蛭*Erpobodella octoculata*之*N. herpobellae*則具有14至17個極圈，而且其傾斜角多數85度，少數則為54度(Spelling and Young, 1983)。而感染長椿*Blissus leucopterus hirtus*之*N. blissi*其極圈則多達37至40個(Liu and McEwen, 1977)。蜜蜂微孢子蟲病病原*N. apis*則具有18個(Wildfuhr and Fritisch, 1969)，Schopfseck and Danneel (1962)則認為有44個之多。在本研究中，發現極圈之數目有13個(圖五)或16~17個(圖六)，且由孢子內部構造判斷，應已充分發育



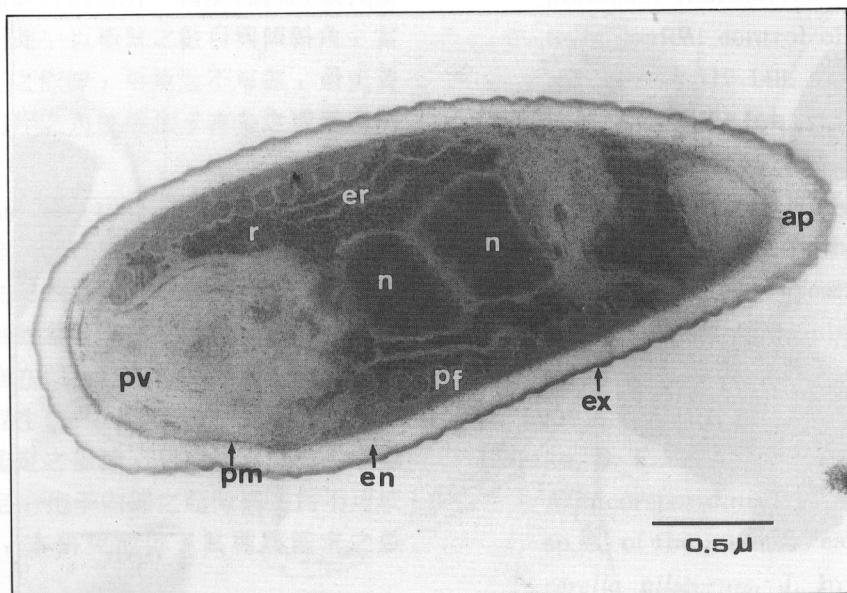
圖三 典型雙倍體核外有一些內質網(er)，鰓葉層區(lr)。

Fig.3. Lamellar region (lr) of polaroplast and endoplasmic reticulum (er) at the outside of typical diplokaryon.

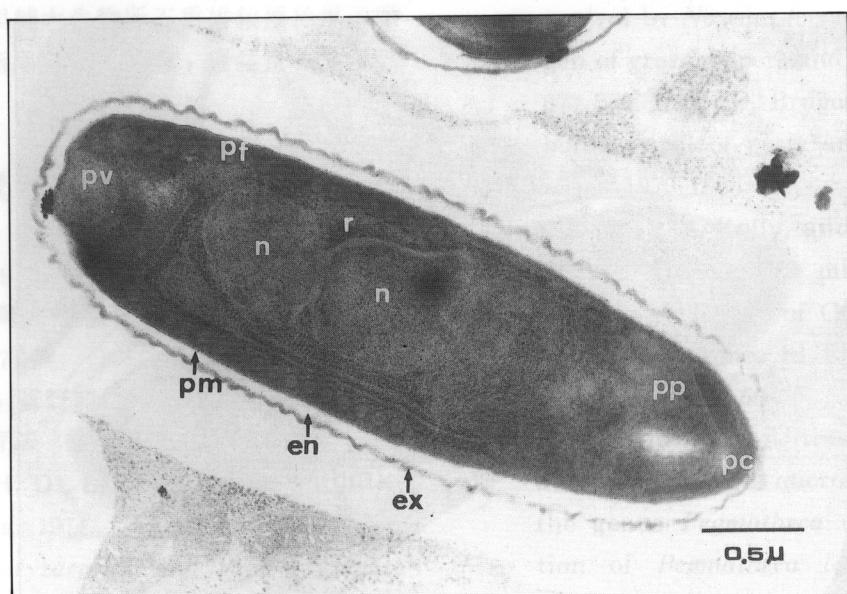


圖四 垂管(mb)前端與極帽(pc)接觸部分可見9個微孔(ma)蓮蓬頭狀物，極質前部分為鰓葉層區(lr)，後部份為囊區(vr)，並有細胞質溝(CG)出現。

Fig.4. A shower-nozzle with 9 microaperture (ma) is seen between polar cap (pc) and manubrium (mb), polaroplast is composed of lamellar region (lr) in the former and vesicular region (vr) in the latter, cytoplasmic groove (cg) appears in cytoplasm.

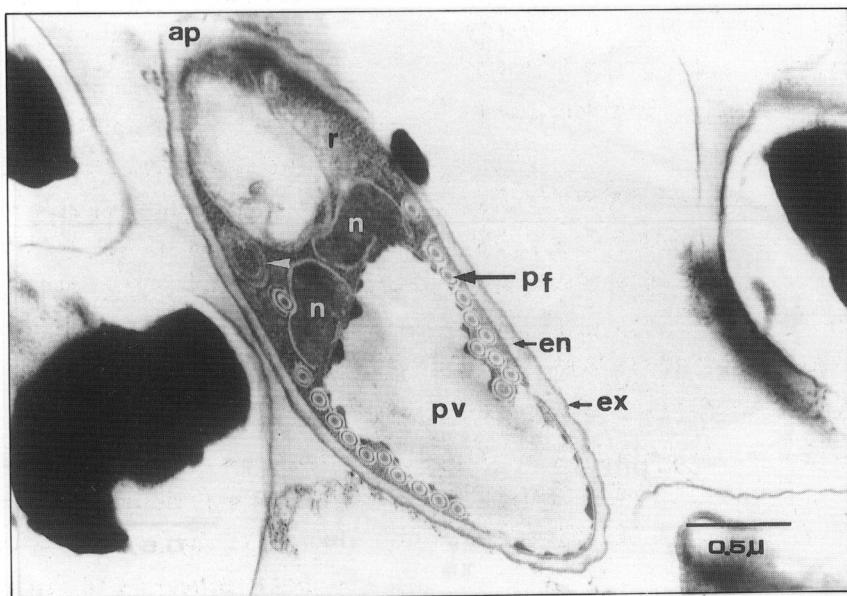


圖五 孢子後端具一大後空泡(pv)，兩側極圈之聯線與孢子縱軸所形成之傾斜角為37至40度，兩側各具13個極圈。
Fig.5. Posterior vacuole (pv) in the end pole of spore, 13 coils at two sides forms 37-40° tile angle with the longitude axis.



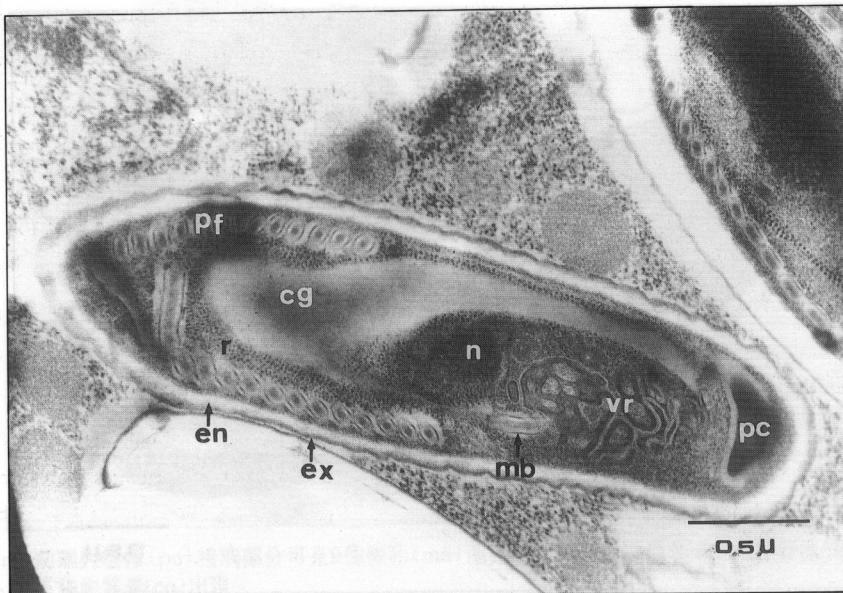
圖六 兩側極圈數達16~17個，傾斜角為76度，且後空泡較小。

Fig.6. Sixteen or 17 coils at two sides forms 76° tile angle with the longitude axis and smaller posterior vacuole in the end pole of spore.



圖七 極質與後空泡空化，雙倍體核呈左右並列，兩側之極圈數10~11個，並出現雙層膜質包住之顆粒性胞器(短箭頭所指)，後空泡佔孢子之二分之一以上。

Fig.7. Polaroplast and posterior vacuole are emptied, diplokaryon makes an array in cross axis, 10-11 coils at two sides, two membrane-bounded organelle with granule is shown as arrow.



圖八 孢子非常細長，前端鈍圓而後端尖削，細胞質溝擴大化，僅見極質囊區(一般孢子前端尖削，後端鈍圓)。

Fig.8. Slim spore as shown in the anterior of dull round and sharp pole in the posterior is not usual as normal which hold opposite, cytoplasmic groove is enlarged and vesicular region is appeared in polaroplast only.

。極圈之傾斜角則為37~44度(圖五)或76度(圖六)。因此，以極絲之數目與傾斜角，當做分類鑑定之依據，可能並不可靠，最主要原因在於切片之角度與孢子本身之成熟度將影響觀察之結果。

Sato *et al.* (1982)認為，極質的構造與核糖體之排列，也能當做微孢子蟲種類分別之依據。在圖四中，可見極質分成兩個部分，前半部為鰓葉層，成馬蹄狀，後半部為囊質區，鑲嵌在前者內，極質因發育時期差異而呈現多型性(徐，未發表)，此種特性確可做為種類鑑定之依據。目前從事於微孢子蟲分類與鑑定，孢子內部之超微構造為不可或缺之證據，本研究提供了其種類鑑定之依據。

誌謝

本研究承蒙國科會(NSC-77-0409-B002-85)補助經費，特此致謝。另中研院動物所李文蓉教授與輔大生物所王重雄教授於電子顯微技術之指導與結果討論，獲益良多，謹致由衷謝忱。

參考文獻

徐泰浩。1984。斜紋夜盜微孢子蟲病之研究。台灣大學植物病蟲害研究所碩士論文。77頁。
小山光男、釜野靜也。1976。斜紋夜盜的大量飼育法。植物防疫30: 470-474。

Burges, H. D., E. U. Canning, and I. K. Hulls. 1974. Ultrastructure of *Nosema oryzaephili* and the taxonomic value of the polar filament. J. Invert. Pathol. 23: 135-139.

Canning, E. U. 1982. An evaluation of

protozool characteristics in relation to biological control of pests. Parasitology 84: 119-149.

- Colley, F. C., L. K. Joe, V. Zaman, and E. U. Canning. 1975. Light and electron microscopical study of *Nosema eurytreme*. J. Invert. Pathol. 26: 11-20.
- Conlon, J. M. 1980. *Nosema locustae*: exemption from requirement of a tolerance. Fed. Register. 45: 31312-31313.
- Gorske, S. F., and J. V. Maddox. 1978. A micorsporidium, *Nosema pilicornis* sp. n. of the purslane sawfly, *Schizocerella pilicornis*. J. Invert. Pathol. 32: 234-243.

- Henry, J. E. 1981. Natural and applied control of insects by protozoa. Ann. Rev. Entomol. 26: 49-73.
- Henry, J. E., and E. A. Oma. 1981. Pest control by *Nosema locustae*, a pathogen of grasshoppers and crickets. pp. 573-588. In H. D. Bruges ed., Microbial control of pests and plant diseases. 1970-1980.

- Kline, D. L., I. F. Kelly, and E. A. Ellis. 1985. A *Nosema*-type microsporidian infection in larvae of *Culicoides* spp. from salt marshes in Florida. J. Invert. Pathol. 45: 60-65.

- Larsson, J. I. R. 1987. Ultrastructure and development of a microsporidium of the genus *Pegmatheca* with description of *Pegmatheca lamellata* new species Microspora Thelohaniidae. Zool. Anaz. 218(5-6): 304-320.

- Larsson, J. I. R. 1989. Light and electron

- microscope studies on the *Jirovecia involuta* new species Microspora Ba-cillidiidae, a new microsporidian parasite of oligochaetes in Sweden. Eur. J. Protistol. 25(2): 172-181.
- Larsson, J. I. R.** 1990. Description of a new microsporidium of the water mite *Limnochares aquatica* and establishment of the new genus *Napamichum* Microspora Thelohaniidae. J. Invert. Pathol. 55(2): 152-161.
- Liu, H. J., and F. L. McEwen.** 1977. *Nosema blissi* sp. n. (Microsporidia: Nosematidae), a pathogen of the chinch bug, *Blissus leucopterus hirtus* (Hemiptera, Lygaeidae). J. Invert. Pathol. 29: 141-146.
- Maddox, J. V., and D. W. Webb.** 1983. A new species of *Nosema* from *Hylobittacus apicalis* (Insecta: Mecoptera:Bittaciae). J. Invert. Pathol. 42: 207-220.
- Malone, L. A., an P. J. Wigley.** 1981. Quantitative studies on the pathogenicity of *Nosema carpopcapsae*, a microsporidian pathogen of the codling moth, *Cydia pomonella* in New Zealand. J. Invert. Pathol. 38: 330-338.
- Milner, R. J.** 1972. *Nosema whitei*, a microsporidian pathgen of some speies of *Tribolium*. II. Ultrastructure. J. Invert. Pathol. 19: 239-247.
- Sato, R., M. Kobayashi, and H. Watanabe.** 1982. Ultrastruture of spores of microsporidians isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. J. Invert. Pathol. 40: 260-265.
- Scholtyssek, E., and R. Danneel.** 1962. Über die Feinstruktur der spore von *Nosema apis*. Deut. Entomol. Z. 9: 471-476.
- Spelling, S. M., and J. O. Young.** 1983. A description of *Nosema herpobdellae* (Microspora: Nosematidae), a parasite of the leech *Erpobdella octoculata* (Hirudinea:Erpobdellidae). J. Invert. Pathol. 41: 350-368.
- Toguebage, B. S., and G. Bouix.** 1989. *Nosema galerucellae* new speies of microsporidian protozoa microspora parasite of *Galeruella luteola* Muller Chrysomellidae Coleoptera development cycle and ultrastructure. Eur. J. Protistol. 24(4): 346-353.
- Undeen, A. H., and N. D. Epsky.** 1990. *In vitro* and *in vivo* germination of *Nosema locustae*. (Microspora. Nosematidae)spore. J. Invert. Pathol. 56(3): 371-379.
- Whitlock, V. H., and S. Johnson.** 1990. Stimuli for the *in vitro* germination and inhibition of *Nosema locustae* (Microspora, Nosematidae)spores. J. Invert. Pathol. 56(1): 57-62.
- Wildfuhr, V. W., and W. Fritzsch.** 1969. The fine structure of species of *Nosema apis*. Angew. Parasitol. 10(1): 39-52.

收件日期：1991年7月24日

接受日期：1991年10月14日