

环境对蝗虫微孢子虫孢子能量代谢和应激反应的影响

郭玮琦^{1,2}, 康晗晔^{1,2}, 霍帆^{1,2}, 张航悦^{1,2}, 张娜^{1,2}, 季荣^{1,2}, 扈鸿霞^{1,2*}

1 新疆师范大学 生命科学学院, 中亚区域跨境有害生物联合控制国际研究中心, 新疆特殊环境物种多样性应用与调控重点实验室, 新疆 乌鲁木齐

2 塔城昆虫迁飞生物学新疆野外科学观测研究站, 新疆 塔城

郭玮琦, 康晗晔, 霍帆, 张航悦, 张娜, 季荣, 扈鸿霞. 环境对蝗虫微孢子虫孢子能量代谢和应激反应的影响[J]. 微生物学报, 2025, 65(5): 2229-2239.

GUO Weiqi, KANG Hanyue, HUO Fan, ZHANG Hangyue, ZHANG Na, JI Rong, HU Hongxia. Effects of environment conditions on spore energy metabolism and stress responses of *Paranosema locustae*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(5): 2229-2239.

摘要: 蝗虫微孢子虫(*Paranosema locustae*)作为一种环境友好的生物防治剂, 在蝗虫生物防治中具有广阔的应用潜力。然而, 在实际应用中, 其效果会受到多种环境因素的影响。因此了解蝗虫微孢子虫对不同环境的抗性差异, 对其在生物防治中的应用至关重要。【目的】探究不同环境条件对蝗虫微孢子虫能量代谢和应激反应, 为蝗虫微孢子虫的环境适应性提供理论基础。【方法】将蝗虫微孢子虫孢子制剂暴露于3种可控的实验环境中, 分别是40 °C干燥环境、20 °C水环境以及干燥条件下紫外线($\geq 100 \mu\text{W}/\text{cm}^2$)辐照不同时间。通过酶标仪、激光共聚焦显微镜和相差显微镜, 分别测定处理后的蝗虫微孢子虫感染蝗虫的生存曲线、孢子发芽率、ATP含量、蛋白量、活性氧(active oxygen, ROS)水平以及海藻糖含量。【结果】在20 °C水环境中处理后, 蝗虫微孢子虫的发芽率降低, 感染蝗虫的中位生存时间延长; 同时, 其ATP和ROS水平显著上升。在40 °C干燥环境下, 孢子的ATP浓度和ROS水平无显著变化, 发芽率以及感染蝗虫的生存曲线与对照组相比也无显著差异。此外, 在高强度紫外线照射($\geq 100 \mu\text{W}/\text{cm}^2$)下, 蝗虫微孢子虫的ATP浓度也显著上升, ROS反应增强, 但发芽率以及感染蝗虫的生存曲线未出现显著变化。【结论】干燥状态的蝗虫微孢子虫对环境具有更强的抗性, 而长时间处于液体环境中会导致孢子活力降低甚至丧失。这些结果为蝗虫微孢子虫生物治蝗制剂的保存方法和应用提供了思路, 并为其环境适应性研究提供了理论基础。

资助项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2023D01A45); 新疆维吾尔自治区“三农”骨干人才培养项目(2024SNGGCGC039); 天山英才领军人才项目(TSYCLJ0016)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2023D01A45), the Key Personnel Training Program for Agriculture, Rural Areas, and Rural Residents of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2024SNGGCGC039), and the Tianshan Leading Talents Program (TSYCLJ0016).

*Corresponding author. E-mail: huhongxia111@126.com

Received: 2024-12-12; Accepted: 2025-01-07; Published online: 2025-03-06

关键词：蝗虫微孢子虫；环境适应性；ATP；ROS；海藻糖

Effects of environment conditions on spore energy metabolism and stress responses of *Paranosema locustae*

GUO Weiqi^{1,2}, KANG Hanyue^{1,2}, HUO Fan^{1,2}, ZHANG Hangyue^{1,2}, ZHANG Na^{1,2}, JI Rong^{1,2}, HU Hongxia^{1,2*}

1 Xinjiang Key Laboratory of Special Species Conservation and Regulatory Biology, International Research Center of Cross-border Pest Management in Central Asia, School of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi, Xinjiang, China

2 Tacheng Insect Migratory Biology Observation and Research Station of Xinjiang, Tacheng, Xinjiang, China

Abstract: *Paranosema locustae*, an environmentally friendly biocontrol agent, holds significant potential for managing locusts. However, its application is affected by various environmental factors. Understanding the resistance differences of *P. locustae* under different conditions is essential for its application in biocontrol. **[Objective]** To study the effects of different environmental conditions on the energy metabolism and stress responses of *P. locustae*, providing a theoretical foundation for its environmental adaptability. **[Methods]** Spores of *P. locustae* were exposed to three controlled experimental environments: a dry environment at 40 °C (40 °C GR), a wet environment at 20 °C (20 °C SR), and ultraviolet irradiation under dry conditions ($\geq 100 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) (ZW) for varying time periods. We employed a microplate reader, laser confocal microscopy, and differential interference contrast microscopy to assess the survival curves of infected locusts and the spore germination rate, ATP level, protein content, reactive oxygen species (ROS) level, and trehalose level of *P. locustae*. **[Results]** In the 20 °C SR group, *P. locustae* showed a decrease in the germination rate and notable rises in ATP and active oxygen (ROS) levels, and the median survival time of infected locusts increased. The 40 °C GR group showed no significant changes in the ATP level, ROS level, spore germination rate, or the survival curve of infected locusts compared with the control group. The ZW group showed increases in the ATP and ROS levels, but no significant change in the germination rate or the survival curve of infected locusts. **[Conclusions]** Dry spores of *P. locustae* exhibit greater resistance to environmental stress, while prolonged exposure to liquid conditions leads to a decrease or even loss of spore viability. These findings provide insights for the preservation and application of *P. locustae* formulations, establishing a theoretical basis for revealing its environmental adaptability.

Keywords: *Paranosema locustae*; environmental adaptability; ATP; ROS; trehalose

微孢子虫作为真菌界细胞内寄生病原体, 能够感染大部分无脊椎动物和脊椎动物^[1-3]。其基因组的压缩导致微孢子虫严重依赖宿主细胞资源^[4-5]。蝗虫微孢子虫(*Paranosema locustae*)专性寄生于蝗虫, 是最早开发和登记的蝗虫防治微生物制剂, 也是目前唯一开发用于害虫防治的微孢子虫, 田间应用广泛^[6-7]。在环境阶段, 微孢子虫具有一个保护性结构——孢子壁, 由3层结构组成, 由外到内依次为孢子外壁(exospore)、孢子内壁(endospore)和原生质膜(plasma membrane)^[8]。孢子外壁由致密的淀粉纤维状蛋白质基质构成, 表面均匀但不光滑, 有突起, 为微孢子虫提供了物理抗压能力, 以抵御外界环境胁迫^[9]。微孢子虫寄生的第一步是发芽, 在合适的环境刺激下, 孢子极管外翻^[10]。极管的吐出以及孢子内容物的运输发生在极短时间内, 仅需1.6 s^[11], 最终侵染性的孢质团被转运到宿主细胞中, 完成寄生过程^[12]。孢子发芽后, 随着核心区域的再水化, 其相态由亮转变为暗, 悬浮液散射行为的改变导致孢子萌发期间光密度(optical density, OD)的损失^[13-14]。因此, 通过测定OD₆₃₀的吸收值, 可以反映微孢子虫的发芽情况。

在细菌芽孢中, ATP会激发芽孢萌发, 母细胞中ATP的产生会影响子芽孢的ATP库^[15]。活性氧(reactive oxygen species, ROS)是呼吸作用的副产品, 与功能障碍和疾病广泛相关, 是疾病期间积累的功能失调线粒体的产物, 各种应激因素会导致生物体内的ROS积累^[16-17]。在环境阶段, 微孢子虫无法获得能量, 为了应对外界刺激, 只能通过消耗自身能量物质来合成ATP以应对应激反应, 最常用的能源物质就是海藻糖。海藻糖存在于多种生物体中, 发挥着多种生物学功能, 如渗透保护和作为毒力因子等。在热、冷、氧化、干燥等环境压力下, 海藻糖被合成为应激反应因子, 而在真菌孢子中, 它可以作为能量和碳的来源, 在发芽过程中迅速消耗^[18-20]。此外, 在急性营养应激条件下,

蛋白质也可以作为能量来源, 细胞通过蛋白酶体和自噬系统, 利用翻译抑制和降解机制来响应营养应激并重组^[21]。

蝗虫微孢子虫生长和繁殖的适宜温度在20–35 °C范围内, 但孢子制剂的存放条件一般是在–20 °C至–10 °C环境下冷冻保存。应用时, 需先将孢子母液化冻, 并添加助剂配制成微孢子虫制剂使用, 由于蝗虫防治时期多在夏季, 孢子制剂运输到野外需要经过长时间的常温液体环境保存, 这制约了其远距离运输和大规模推广应用^[22]。微孢子虫经消化道感染寄主^[23], 洒到田间后如果不能快速被宿主摄食, 还需要面临野外干燥、高温和紫外等环境。一般情况下, 生物体面对热、紫外线辐射和干燥条件会出现显著的应激反应, 而长时间的应激可能会导致生物死亡。然而, 关于外界环境因子是否会影响蝗虫微孢子虫的杀虫效果, 目前尚未见研究报告。本研究将蝗虫微孢子虫暴露在3种可控的实验环境中: 20 °C水环境(20 °C SR)、40 °C干燥环境(40 °C GR)、辐照强度 $\geq 100 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 的紫外照射(ZW), 分别模拟运输环境、野外高温和紫外照射环境。检测蝗虫微孢子虫在不同环境条件下孢子发芽率、感染蝗虫后的孢子毒力和感染力、ATP含量、蛋白量、ROS水平以及海藻糖含量。旨在了解环境孢子阶段蝗虫微孢子虫的环境适应性, 找到蝗虫微孢子虫的最佳存储和应用环境, 为其推广应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 蝗虫微孢子虫的处理

蝗虫微孢子虫由中国农业大学植物保护学院提供, 经冷链运输至实验室。使用6层医用纱布过滤, 去除大部分蝗虫组织等杂质, 经血细胞计数后, 将孢子稀释至 1×10^9 孢子/mL, 并分装至1.5 mL离心管中, 于–20 °C保存备用。

取1 mL孢子悬浮液(1×10^9 孢子/mL)用蒸馏水洗涤3次。对于20 °C水环境处理, 将孢子悬

浮液置于 20 °C 的金属浴中, 分别处理 5、10 和 15 d。对于 40 °C 干燥环境处理, 将孢子悬浮液移至滤纸上, 室温风干后, 置于底部含硅胶干燥剂的 1.5 mL 离心管中(相对湿度 $\leq$ 30%), 并在 40 °C 的金属浴中处理 5、10 和 15 d。对于紫外环境处理, 将孢子悬浮液转移到 6 cm 培养皿中, 使用 2 个波长为 253.7 nm 的 15 W 紫外灯(江苏巨光光电科技有限公司)放置在孢子上方 30 cm 处, 以 $\geq 100 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 的强度垂直照射(不盖培养皿, 相对湿度 $\leq$ 30%), 室温下照射 8、16 和 24 h。设置阳性对照为-20 °C 冷冻保存的蝗虫微孢子虫悬液, 阴性对照为将蝗虫微孢子虫置于 100 °C 沸水中处理 10 min。-20 °C 冷冻保存的蝗虫微孢子虫悬液(CK); 100 °C 沸水处理 10 min (100 °C 10 min); 20 °C 水环境处理 5 d (20 °C SR 5 d); 20 °C 水环境处理 10 d (20 °C SR 10 d); 20 °C 水环境处理 15 d (20 °C SR 15 d); 40 °C 干燥环境处理 5 d (40 °C GR 5 d); 40 °C 干燥环境处理 10 d (40 °C GR 10 d); 40 °C 干燥环境处理 15 d (40 °C GR 15 d); 紫外光持续照射 8 h (ZW 8 h); 紫外光持续照射 16 h (ZW 16 h); 紫外光持续照射 24 h (ZW 24 h)。

1.2 孢子发芽率检测

将蝗虫微孢子虫悬浮液稀释至浓度为 10^8 孢子/mL, 5 000 r/min 离心 1 min, 弃去上清液。加入 1 mL 0.25 mol/L $\text{NaHCO}_3\text{-Na}_2\text{CO}_3$ 溶液, 充分混匀后, 在 28 °C 金属浴中放置 2 h, 使孢子充分发芽。发芽结束后 5 000 r/min 离心 1 min, 弃去上清液, 加入 1 mL 蒸馏水。使用 Infinite M200 PRO 全波长酶标仪(Tecan 上海贸易有限公司)在 OD_{630} 处测定吸光度^[13,24]。同时检测发芽孢子和未发芽孢子的 OD_{630} 吸光度, 每组进行 3 次生物学重复, 每个样本进行 3 次技术重复, 同一稀释浓度下, 发芽率计算如公式(1)所示。

$$\text{发芽率} = \frac{(\text{发芽起始液 } OD_{630}) - (\text{发芽终止液 } OD_{630})}{\text{发芽起始液 } OD_{630}} \times 100\% \quad (1)$$

1.3 蝗虫的饲养和感染后的生存试验

本研究使用的模式生物为东亚飞蝗(*Locusta migratoria manilensis*), 在温度为 (30 ± 2) °C、相对湿度为 $(50 \pm 5)\%$ 、明暗周期为 14:10 的恒温箱中孵化。孵化后的蝗虫在温度 (30 ± 2) °C、相对湿度 $(50 \pm 5)\%$ 、恒定光照的昆虫培养室内饲养, 饲喂新鲜水培小麦。当蝗虫达到三龄期时, 进行蝗虫微孢子虫感染。用血细胞计数板计数, 将孢子稀释至浓度为 1×10^8 孢子/mL。接种前饥饿 12–24 h 时, 使用移液器喂入 5 μL 孢子悬液, 每只蝗虫接受 5×10^5 孢子的感染剂量^[25]。设置阳性对照组为-20 °C 保存的蝗虫微孢子虫感染的蝗虫; 阴性对照组为未感染微孢子虫的蝗虫。生存实验中, 每个感染实验组包含 50 只蝗虫。每天记录并移除死亡的蝗虫(排除非自然死亡)。

1.4 ATP 和蛋白浓度检测

通过 ATP 浓度与蛋白浓度的比值来表示不同处理下蝗虫微孢子虫的 ATP 浓度。使用增强型 ATP 检测试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司), 按照试剂盒提供的方法绘制标准曲线。取 1×10^9 孢子/mL 的孢子悬浮, 沉淀后加入 1 mL 裂解液, 加入研磨珠, 使用 JXFSTPRP-24 全自动样品研磨仪(上海净信实业发展有限公司), 以 70 Hz 的频率研磨 1 min, 间隔 5 s, 研磨 5 次。在 4 °C、12 000 $\times g$ 离心 5 min, 取上清液。在 96 孔板中加入 100 μL ATP 检测工作液, 室温放置 3–5 min 以清除本底 ATP。加入 20 μL 样品并混匀, 使用 Infinite M200 PRO 全波长酶标仪进行化学发光检测(luminometer)。根据 ATP 检测标准曲线($y = 56.636x + 80.12$; $R^2 = 0.9976$)确定样本 ATP 含量。

使用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司), 按试剂盒提供的方法绘制标准曲线。取 20 μL 待测样品, 每个孔中加入 200 μL 的 BCA 工作液, 在 37 °C 下放置 20 min。使用 Infinite M200 PRO 全波长酶标仪

在波长 OD_{562} 下进行检测, 并根据标准曲线($y=0.7212x+0.1504$; $R^2=0.9922$)确定蛋白浓度。

1.5 活性氧(ROS)检测

使用无血清昆虫细胞培养基将探针 DCFE-DA 稀释至 1:1 000。对照组取未处理的微孢子虫, 将探针装载于细胞内, 37°C 下孵育 20 min 后, 去除 DCFE-DA, 使用无血清培养液洗涤孢子 3 次, 然后在荧光显微镜下检测。实验组为环境因子刺激后的细胞, 装载探针后在 37°C 下孵育 20 min, 去除 DCFE-DA 后, 用无血清培养液洗涤细胞 3 次。在相同的激光强度下, 使用激光共聚焦显微镜(徕卡仪器有限公司)观察。使用 ImageJ win64 软件处理荧光信号强度, 并根据荧光信号强度数据化微孢子虫体内的 ROS 水平。

1.6 海藻糖含量检测

使用海藻糖检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司), 根据海藻糖标准品绘制标准曲线。将处理好的微孢子虫(1×10^9 个孢子)加入 1 mL 海藻糖提取液, 加入研磨珠后, 在全自动样品研磨仪(上海净信实业发展有限公司)中, 以 70 Hz 的频率研磨 1 min, 间隔 5 s, 研磨 5 次。室温静置 45 min, 振荡 3–5 次, 冷却后 $8\,000\times g$ 常温离心 10 min, 取上清液。取 60 μL 样本和 240 μL 现配的工作液, 混匀后在 95°C 下水浴 10 min, 自然冷却至室温后, 取 200 μL 至 96 孔板中, 使用 Infinite M200 PRO 全波长酶标仪在波长 OD_{620} 下检测。根据标准曲线($y=3.7774x+0.0862$; $R^2=0.9953$), 按照 1×10^8 个孢子计算微孢子虫的海藻糖含量, 如公式(2)所示。

$$\text{海藻糖含量}(\mu\text{g}/10^8\text{孢子})=1\,000\times V_1\times x\div (10\times V_1\div V_2)=100x \quad (2)$$

式中: V_1 为反应体系中的样本体积, 0.06 mL; V_2 为提取液总体积, 1 mL; 10 为孢子总数, 10 亿; 1 000 为单位换算系数。

1.7 数据分析

所有数据及统计检验均采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件处理。数据采用单因素方差分析或非配对 t 检验进行分析, 并采用 Dunnett 多重比较检验将实验组与对照组进行比较。所有标准曲线使用 Excel 制作[原始数据存储在微生物科学数据中心 (<http://nmdec.cn>), 编号为 NMDCX0002081]。生存曲线采用 GraphPad Prism 8 进行数据分析和绘制, P 值采用 Mantel-Cox 检验计算。 P 值的显著性水平用星号表示, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 和 $****P<0.0001$; ns 表示不显著($P\geq 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 不同环境条件下蝗虫微孢子虫的发芽率

与阳性对照组相比, 紫外和干燥条件均未导致孢子发芽率降低(图 1A、1C)。然而, 在 20°C 水环境中处理的孢子发芽率显著下降, 处理 15 d 后, 其发芽率与阴性对照组相比无显著差异(图 1B)。发芽处理后, 大部分孢子内容物并未释放, 仍保持明亮状态(图 1C)。

2.2 不同环境条件处理蝗虫微孢子虫后感染东亚飞蝗的生存曲线

在 20°C 水环境中处理的蝗虫微孢子虫对蝗虫的毒力显著下降, 尤其是处理 15 d 后, 感染蝗虫的中位生存时间达到 42.5 d, 与未感染蝗虫的生存曲线无显著差异, 而阳性对照组的中位生存时间为 19 d (图 2A)。相比之下, 40°C 干燥环境处理的蝗虫微孢子虫感染蝗虫后的生存曲线并与阳性对照组相比无显著差异(图 2B)。紫外处理组感染蝗虫的生存曲线与阳性对照组相比同样无显著变化(图 2C)。

2.3 环境刺激对孢子 ATP 和蛋白浓度的影响

ATP 水平的变化是孢子阶段对环境变化的

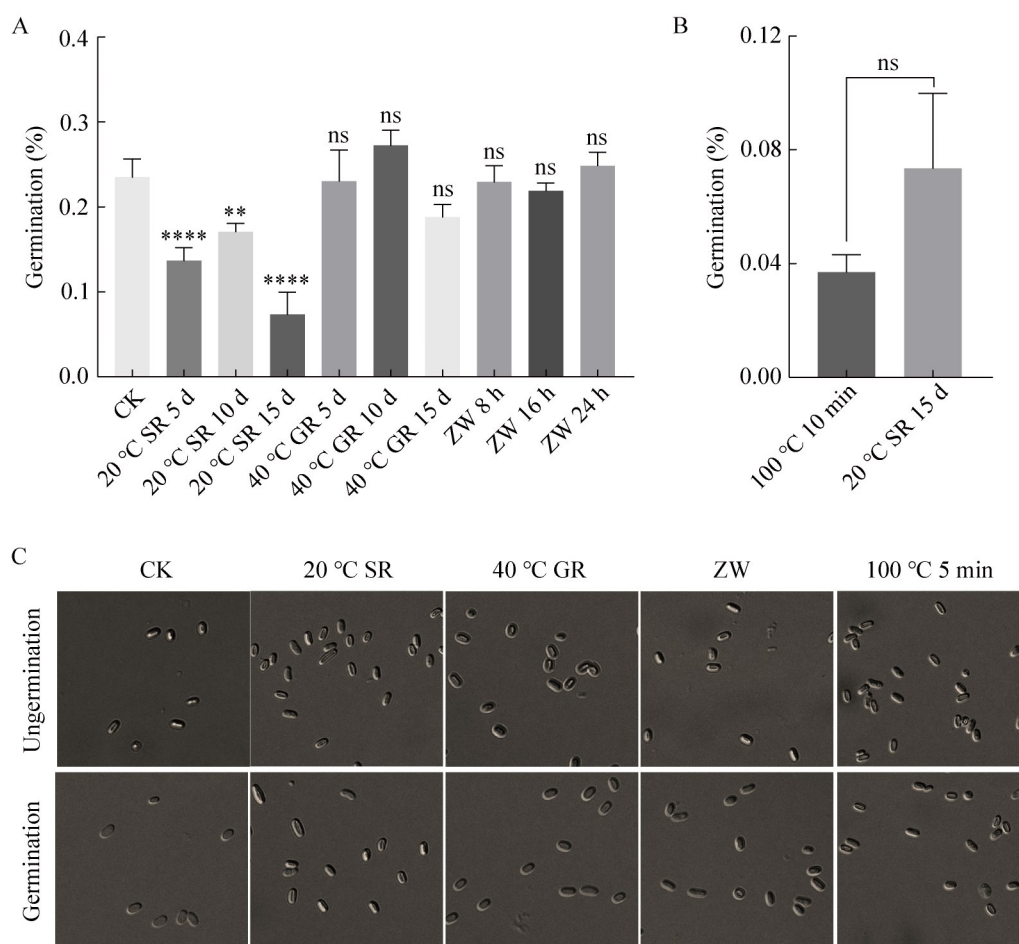


图1 蝗虫微孢子虫在不同环境条件处理后的孢子发芽率。A: 不同环境条件处理后孢子发芽率的变化; B: 100 °C处理10 min与20 °C水环境处理15 d的比较; C: 未处理孢子和使用孢子发芽液处理2 h后, 相差显微镜观察孢子转变为暗态。**: $P < 0.01$; ****: $P < 0.0001$; ns: 不显著。

Figure 1 Spore germination rate of *Paranosema locustae* treated under different environmental conditions. A: The change in spore germination rate after treatment under different environmental conditions; B: Comparison between treatment at 100 °C for 10 min and treatment at 20 °C for 15 d in water environment; C: After treatment with spore germination solution for 2 h, spores were observed darken under phase contrast microscopy. **: $P < 0.01$; ****: $P < 0.0001$; ns: No significant difference.

一种响应。在 40 °C 干燥条件下, 孢子 ATP 浓度与对照组相比无显著变化。相比之下, 在 20 °C 水环境处理后, 蝗虫微孢子虫的 ATP 浓度显著上升(图 3A)。此外, 在水环境和紫外环境处理下, 蝗虫微孢子虫的蛋白质含量显著下降(图 3B)。

2.4 不同环境下蝗虫微孢子虫体内 ROS 水平的变化

与 ATP 的产生类似, ROS 作为呼吸作用的副产物也会随之产生。在水环境和紫外照射下, 蝗虫微孢子虫孢子体内的 ROS 水平上升, 而在干燥环境下蝗虫微孢子虫孢子的 ROS 水平与阳

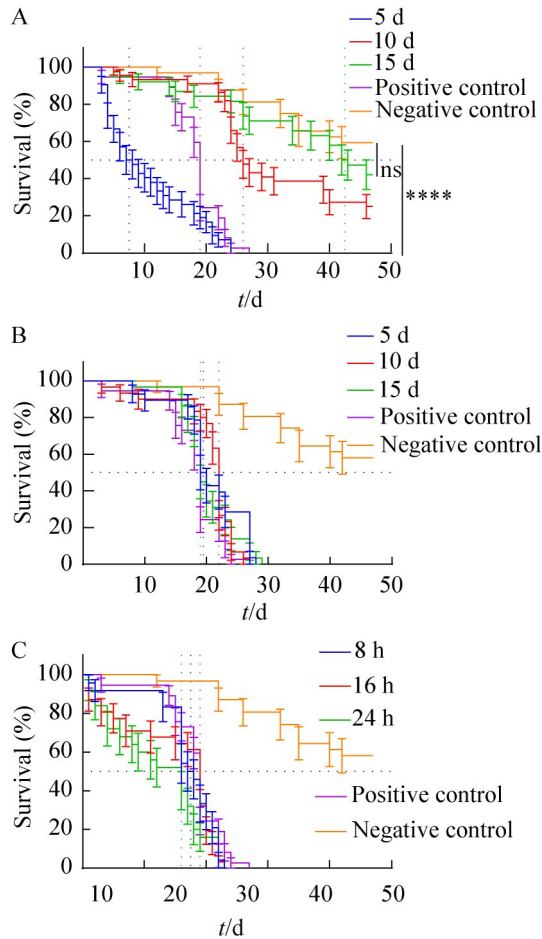


图2 不同环境条件处理蝗虫微孢子虫后感染蝗虫的生存曲线。A: 20 °C水环境处理蝗虫微孢子虫5、10、15 d后感染蝗虫的生存曲线; B: 40 °C干燥环境处理蝗虫微孢子虫5、10、15 d后感染蝗虫的生存曲线; C: 紫外照射处理蝗虫微孢子虫8、16、24 h后感染蝗虫的生存曲线。****: $P<0.0001$; ns: 不显著。

Figure 2 Survival curves of locusts infected with *Paranosema locustae* under various environmental conditions. A: Survival curves of locusts infected with *P. locustae* following water treatment at 20 °C for 5, 10, and 15 d; B: Survival curves of locust microsporidia infected with *P. locustae* following dry treatment at 40 °C for 5, 10 and 15 d; C: Survival curves of locusts infected with *P. locustae* following UV irradiation for 8, 16, and 24 h. ****: $P<0.0001$; ns: No significant difference.

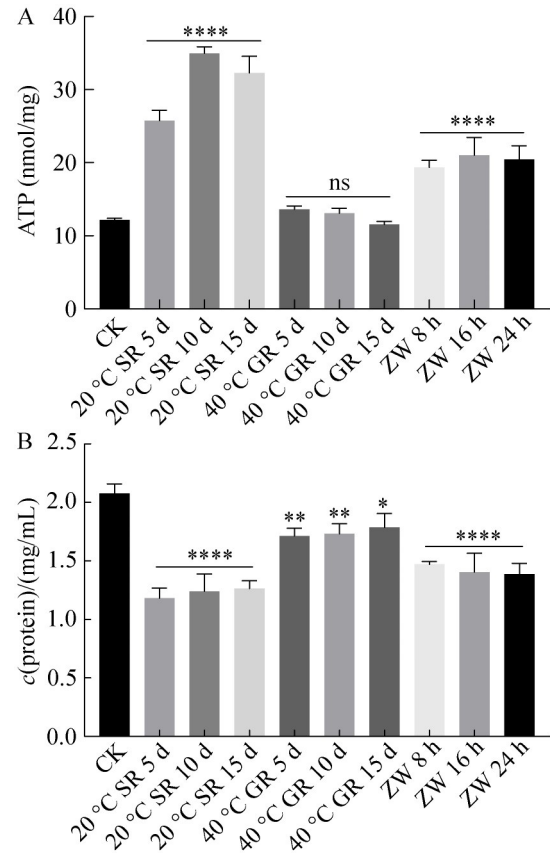


图3 环境因子对蝗虫微孢子虫ATP和蛋白浓度的影响。A: 蝗虫微孢子虫在不同环境条件处理下孢子体内的ATP浓度; B: 不同环境条件处理后 1×10^9 个蝗虫微孢子虫孢子的蛋白总量。*: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ****: $P<0.0001$; ns: 不显著。

Figure 3 Effects of environmental factors on ATP and protein concentrations in *Paranosema locustae*. A: ATP concentration in *P. locustae* under different environmental conditions, unit nmol/mg; B: Total spore proteins of 1×10^9 *P. locustae* treated under different environmental conditions. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ****: $P<0.0001$; ns: No significant difference.

性对照组相比无显著变化(图 4)。

2.5 环境对蝗虫微孢子虫海藻糖产生与消耗的影响

环境条件的变化并未显著影响蝗虫微孢子虫体内海藻糖水平。在 20 °C 水环境下, 孢子体内海藻糖含量与对照组相比也无显著差异(图 5)。

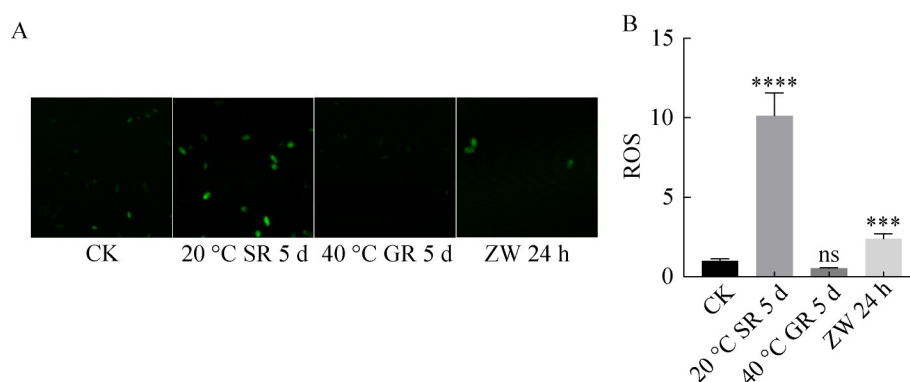


图4 不同条件处理下微孢子虫体内ROS水平的变化。A: 激光共聚焦显微镜观察图像(部分); B: 通过ImageJ处理得到的荧光信号强度数据分析。***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$; ns: 不显著。

Figure 4 Changes of ROS levels in *Paranosema locustae* under different treatment conditions. A: Laser confocal microscope observation images (partial); B: Data analysis of fluorescence signal intensity obtained by processing images with ImageJ. ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$; ns: No significant difference.

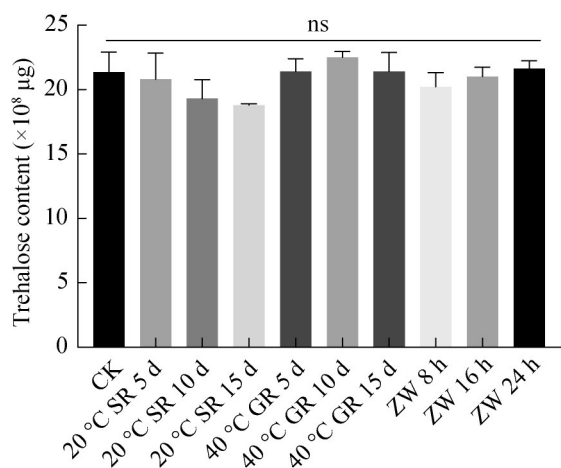


图5 蝗虫微孢子虫在不同环境条件处理后的孢子海藻糖水平的变化。ns: 不显著, $P \geq 0.05$ 。

Figure 5 Changes of trehalose levels in spores of *Paranosema locustae* treated under different environmental conditions. ns: No significant difference, $P \geq 0.05$.

3 讨论

蝗虫微孢子虫的生命周期涵盖环境中的休眠孢子形式和宿主细胞中的增殖形式^[26]。自引入中国以来,它被广泛用作防治蝗虫的生物制剂^[27-29]。然而,在运输和应用过程中,蝗虫微

孢子虫可能面临-20 °C 的冷冻和室温(尤其是水环境)下的储存。当孢子被投放至野外环境时,若无法迅速侵入宿主体内,则要面临光照、干燥、潮湿等多种环境压力。休眠阶段的蝗虫微孢子虫对不同环境条件的能量代谢和氧化应激的响应,反映了孢子对环境的适应能力,这对于其合理且大规模的应用至关重要。

本研究揭示,蝗虫微孢子虫对干燥环境展现出极强的抗性。即便在 40 °C 的高温条件下,干燥状态的孢子发芽率、感染蝗虫的生存曲线与对照组相比均无显著变化(图 2B)。同时,ATP 和 ROS 水平维持在较低水平(图 3A、图 4),这表明干燥条件更易于使微孢子虫进入休眠状态。与极端微生物南极热土副地芽孢杆菌(*Parageobacillus thermantarcticus*)相似,相较于水合状态的孢子,干燥状态的微生物孢子对极端环境更具抵抗力^[30]。作为蝗虫微孢子虫环境阶段的细胞形态,孢子主要通过空间上利用多种机制或在时间上经历长期休眠来实现分散,例如某些类型的真菌孢子在干燥状态下更易达到真正的休眠状态^[31]。辐射是自然界中常见的环境因子。当辐射作用于生物靶标时,会发生直接辐射效应(即 DNA、蛋白质等细胞成分直接

吸收能量)与间接辐射效应(即细胞靶标与水辐射分解产生的自由基发生相互作用)^[32-33]。孢子具备缓慢干燥、自然折叠、核心缓慢脱水等生理功能,从而保护其免受高温、干旱或其他分子的影响^[34]。本研究发现,在紫外线处理蝗虫微孢子虫 24 h 后,孢子 ATP 和 ROS 水平上升(图 3、图 4),但发芽率并未下降(图 1),同时感染蝗虫的生存曲线与阳性对照组相比也无显著差异(图 2C)。这表明干燥状态的孢子增强了蝗虫微孢子虫对紫外线的耐受能力。上述结果说明,缓慢的自然干燥使蝗虫微孢子虫进入真正的休眠状态,提高了其对环境的耐受性,即使长时间处于 40 °C 高温环境或遭受高剂量紫外辐射,这种干燥孢子有助于蝗虫微孢子虫(作为一种机会性病原体)的扩散,这也是作为生防制剂的蝗虫微孢子虫的一大优势特点。

相反,在 20 °C 水环境下,孢子 ATP 和 ROS 水平均显著上升,能量的消耗和 ROS 水平的增加导致孢子无法有效发芽。虽然海藻糖是真菌、细菌和昆虫的主要能量来源,但本研究发现蝗虫微孢子虫在休眠阶段并不利用海藻糖作为能量来源(图 5),而是以蛋白质作为主要的能量来源(图 3B)。水环境中的孢子可能处于萌发状态,但由于缺乏其他刺激,孢子无法发芽,且能量受限,导致孢子陷入急性营养应激状态。在营养应激条件下,蛋白质作为生物体内的能量来源之一,成为孢子的主要能量来源^[21]。长时间的营养应激导致蝗虫微孢子虫孢子活力丧失,最终失去发芽能力(图 1),这也导致了微孢子虫感染蝗虫后,蝗虫的中位生存时间延长(图 2A),这一结果表明,在应用过程中,如果蝗虫微孢子虫不能立即施用于野外,将导致孢子活力下降,最终失去防治效果。

蝗虫微孢子虫专一寄生于蝗虫,孢子阶段是其作为细胞内寄生虫的过渡形态,处于对环境不敏感的状态。这一阶段对环境的抗性是保证其水平传播的重要途径。本研究发现,水环境会导致蝗虫微孢子虫的营养应激,长时间暴

露于水环境会使孢子活力下降,失去对宿主的感染性。野外条件下,蝗虫可通过晒太阳提高体温以抑制真菌感染^[35]。因此,在干燥环境下,蝗虫微孢子虫保持低水平的能量代谢,孢子进入真正的休眠状态,高温不会引起其应激反应;而在高强度紫外照射下,虽然 ATP 和 ROS 水平上升,但发芽率无显著变化,仍能保持对宿主的感染力。这些结果不仅强调了蝗虫微孢子虫对野外环境的适应性,也说明了以干燥固体形式在常温下保存蝗虫微孢子虫制剂的可行性。

4 结论

本研究通过模拟蝗虫微孢子虫在实际应用中可能遭遇的环境条件,探究了这些条件对其能量代谢与应激反应的影响。通过检测孢子发芽率、感染后蝗虫的生存曲线、ATP 水平、蛋白量、ROS 水平以及海藻糖的变化,发现自然干燥的蝗虫微孢子虫孢子对环境的适应能力显著增强。这种干燥状态的孢子可作为其主要保存与应用形式。本研究证实了蝗虫微孢子虫耐干旱、高温和抗紫外线的生物学特性,为后续蝗虫微孢子虫新型制剂的开发与应用提供了坚实的理论支持。

作者贡献声明

郭玮琦:研究构思和设计、数据收集和处理、论文撰写和修改;康韩晔:提供技术支持、协助实验操作;霍帆:数据收集和处理支持、协助实验操作;张航悦:协助实验操作;张娜:协助实验操作;季荣:提供技术支持;扈鸿霞:研究构思和设计、论文撰写和修改、提供技术支持。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] KEELING P. Five questions about microsporidia[J]. *PLoS Pathogens*, 2009, 5(9): e1000489.
- [2] HAN B, WEISS LM. Microsporidia: obligate intracellular pathogens within the fungal Kingdom[J]. *Microbiology Spectrum*, 2017, 5(2): 10-1128.
- [3] CAPELLA-GUTIÉRREZ S, MARCET-HOUBEN M, GABALDÓN T. Phylogenomics supports microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi[J]. *BMC Biology*, 2012, 10: 1-14.
- [4] NAKJANG S, WILLIAMS TA, HEINZ E, WATSON AK, FOSTER PG, SENDRA KM, HEAPS SE, HIRT RP, MARTIN EMBLEY T. Reduction and expansion in microsporidian genome evolution: new insights from comparative genomics[J]. *Genome Biology and Evolution*, 2013, 5(12): 2285-2303.
- [5] KEELING PJ, FAST NM. Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2002, 56(1): 93-116.
- [6] HENRY JE. Experimental application of *Nosema locustae* for control of grasshoppers[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1971, 18(3): 389-394.
- [7] LANGE CE. The host and geographical range of the grasshopper pathogen *Paranosema (Nosema) locustae* revisited[J]. *Journal of Orthoptera Research*, 2005, 14(2): 137-141.
- [8] BIGLIARDI E, SELMI MG, LUPETTI P, CORONA S, GATTI S, SCAGLIA M, SACCHI L. Microsporidian spore wall: ultrastructural findings on *Encephalitozoon hellem* exospore[J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 1996, 43(3): 181-186.
- [9] YANG DL, PAN LX, CHEN ZZ, DU HH, LUO B, LUO J, PAN GQ. The roles of microsporidia spore wall proteins in the spore wall formation and polar tube anchorage to spore wall during development and infection processes[J]. *Experimental Parasitology*, 2018, 187: 93-100.
- [10] CHEN YQ, LV Q, LIAO HJ, XIE ZK, HONG LY, QI L, PAN GQ, LONG MX, ZHOU ZY. The microsporidian polar tube: origin, structure, composition, function, and application[J]. *Parasites & Vectors*, 2023, 16(1): 305.
- [11] JAROENLAK P, CAMMER M, DAVYDOV A, SALL J, USMANI M, LIANG FX, EKIERT DC, BHABHA G. 3-dimensional organization and dynamics of the microsporidian polar tube invasion machinery[J]. *PLoS Pathogens*, 2020, 16(9): e1008738.
- [12] FRANZEN C. How do microsporidia invade cells? [J]. *Folia Parasitologica*, 2005, 52(1/2): 36-40.
- [13] MOIR A. The genetics of bacterial spore germination[J]. *Annual Review of Microbiology*, 44: 531-553.
- [14] SINAI L, ROSENBERG A, SMITH Y, SEGEV E, BEN-YEHUDA S. The molecular timeline of a reviving bacterial spore[J]. *Molecular Cell*, 2015, 57(4): 695-707.
- [15] RAO L, ZHOU B, SERRUYA R, MOUSSAIEFF A, SINAI L, BEN-YEHUDA S. Glutamate catabolism during sporulation determines the success of the future spore germination[J]. *iScience*, 2022, 25(10): 105242.
- [16] PALMA FR, GANTNER BN, SAKIYAMA MJ, KAYZUKA C, SHUKLA S, LACCHINI R, CUNNIFF B, BONINI MG. ROS production by mitochondria: function or dysfunction?[J]. *Oncogene*, 2024, 43(5): 295-303.
- [17] GESSLER NN, AVER'YANOV AA, BELOZERSKAYA TA. Reactive oxygen species in regulation of fungal development[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2007, 72(10): 1091-1109.
- [18] ELBEIN AD, PAN YT, PASTUSZAK I, CARROLL D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule[J]. *Glycobiology*, 2003, 13(4): 17R-27R.
- [19] KUCZYŃSKA-WIŚNIK D, STOJOWSKA-SWĘDRZYŃSKA K, LASKOWSKA E. Intracellular protective functions and therapeutic potential of trehalose[J]. *Molecules*, 2024, 29(9): 2088.
- [20] JAIN NK, ROY I. Effect of trehalose on protein structure[J]. *Protein Science*, 2009, 18(1): 24-36.
- [21] AN H, ORDUREAU A, KÖRNER M, PAULO JA, HARPER JW. Systematic quantitative analysis of ribosome inventory during nutrient stress[J]. *Nature*, 2020, 583(7815): 303-309.
- [22] 赵性宝. 蝗虫微孢子虫在防治蝗害中的作用和制约因素[J]. *农业知识*, 2022(10): 27-28.
- [23] 王丽英, 曹春. 我国蝗虫微孢子虫超微结构与致病特性研究[J]. *草地学报*, 1994, 2(1): 14-21.
- [24] KIKUCHI K, GALERA-LAPORTA L, WEATHERWAX C, LAM JY, MOON EC, THEODORAKIS EA, GARCIA-OJALVO J, SÜEL GM. Electrochemical potential enables dormant spores to integrate environmental signals[J]. *Science*, 2022, 378(6615): 43-49.
- [25] LIU H, WEI XJ, YE XF, ZHANG HH, YANG K, SHI WP, ZHANG JR, JASHENKO R, JI R, HU HX. The immune response of *Locusta migratoria* manilensis at different times of infection with *Paranosema locustae*[J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2023, 114(4): e22055.
- [26] VÁVRA J, LUKEŠ J. Microsporidia and 'the art of living together' [M]// *Advances in Parasitology*. Amsterdam: Elsevier, 2013: 253-319.
- [27] GUO YY, AN Z, SHI WP. Control of grasshoppers by combined application of *Paranosema locustae* and an insect growth regulator (IGR) (cascade) in rangelands in China[J]. *Journal of Economic Entomology*, 2012, 105(6): 1915-1920.
- [28] LOMER CJ, BATEMAN RP, JOHNSON DL, LANGEWALD J, THOMAS M. Biological control of locusts and grasshoppers[J]. *Annual Review of Entomology*, 2001, 46: 667-702.
- [29] SHI WP, WANG YY, LV F, GUO C, CHENG X. Persistence of *Paranosema (Nosema) locustae* (Microsporidia: Nosematidae) among grasshopper

- (Orthoptera: Acrididae) populations in the Inner Mongolia Rangeland, China[J]. *BioControl*, 2009, 54(1): 77-84.
- [30] ROMANO I, CAMERLINGO C, VACCARI L, BIRARDA G, POLI A, FUJIMORI A, LEPORE M, MOELLER R, DI DONATO P. Effects of ionizing radiation and long-term storage on hydrated vs. dried cell samples of extremophilic microorganisms[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(1): 190.
- [31] SEGERS FJJ, DIJKSTERHUIS J, GIESBERS M, DEBETS AJM. Natural folding of airborne fungal spores: a mechanism for dispersal and long-term survival? [J]. *Fungal Biology Reviews*, 2023, 44: 100292.
- [32] HORNECK G, KLAUS DM, MANCINELLI RL. Space microbiology[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2010, 74(1): 121-156.
- [33] MOELLER R, RAGUSE M, LEUKO S, BERGER T, HELLWEG CE, FUJIMORI A, OKAYASU R, HORNECK G, GROUP TSR. STARLIFE-an international campaign to study the role of galactic cosmic radiation in astrobiological model systems[J]. *Astrobiology*, 2017, 17(2): 101-109.
- [34] WYATT TT, WÖSTEN HAB, DIJKSTERHUIS J. Fungal Spores for Dispersion in Space and Time[M]// *Advances in Applied Microbiology*. Amsterdam: Elsevier, 2013, 85: 43-91.
- [35] DAKHEL WH, LATCHININSKY AV, JARONSKI ST. Efficacy of two entomopathogenic fungi, *Metarhizium brunneum*, strain F52 alone and combined with *Paranosema locustae* against the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*, under laboratory and greenhouse conditions[J]. *Insects*, 2019, 10(4): 94.