黄绿绿僵菌对褐飞虱侵染过程的扫描电镜观察*

李茂业** 林华峰*** 金 立 张松影
(安徽农业大学植物保护学院 合肥 230036)

摘 要 本实验利用扫描电镜观察了黄绿绿僵菌 *Metarhizium flavoviride* 菌株分生孢子对褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål) 的侵染过程。结果表明:分生孢子多分布在褐飞虱节间膜、体表的褶皱凹陷等部位,主要以芽管或产生附着胞入侵,然后在体表长出菌丝和产孢。菌体进入寄主血腔后,利用体腔内营养大量增殖、扩散并侵染褐飞虱卵巢中的卵块。侵染卵块的菌丝虽被体液包裹但依然能继续生长,使卵粒失活,抑制害虫下代的数量。通过体表及体内的侵染过程,可直观地表现黄绿绿僵菌对褐飞虱的侵染能力和侵入方式,为评价该菌的杀虫作用和应用前景提供了证据。

关键词 黄绿绿僵菌,褐飞虱,扫描电镜,致病机理

Observations on infection of *Nilaparvata lugens* by *Metarhizium flavoviride* using a scanning electron microscope

LI Mao-Ye** LIN Hua-Feng*** JIN Li ZHANG Song-Ying
(School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract The process by which *Metarhizium flavoviride* conidia infect *Nilaparvata lugens* (Stål) was observed using a scanning electron microscope (SEM). The results show that most conidia were deposited on the intersegmental membranes which are folded regions on cuticle. The germinated conidia of the isolate invaded the cuticle not only directly via germ tubes, but also by producing appressoria during the course of infection. After this hyphae and spores grew on cuticle. Thalluses entered into the hemocoel and then made use of nutrition to reproduce in large quantities, diffussing and infecting the insects' eggmass. Even though covered with humoral hyphae, the infected eggmass still continued to grow but ongoing fungal activity inactivated many eggs thereby reducing the number of insects produced in the next generation. Scanning electron microscopy allowed us to observe the infection process both in vitro and in vivo, thereby providing useful information for evaluating the insecticidal effect and utility of *Metarhizium flavoviride* as a control agent for *N. lugens*.

Key words *Metarhizium flavoviride*, *Nilaparvata lugens*, scanning electron microscope, pathogenesis

自 20 世纪 50 年代以来,褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål) (BPH) 逐渐发展成为亚洲国家水稻的主要害虫之一,由于其具有迁飞性和抗药性等特点,大发生时可造成水稻严重减产,甚至绝收(程家安和祝增荣,2006)。目前,化学防治是褐飞虱的主要防治方法,但由于这种方法对人类健康和环境造成的危害,迫使人们寻求与环境相和谐的生物农药替代化学农药。白僵菌、绿僵菌等虫生真菌是以独特的方式侵入,其分生孢子主要通过表皮萌发侵入昆虫体壁,也可通过消化道、伤口等途径侵入虫体(季香云和杨长举,2003; Liu *et al.*, 2010),这为褐飞虱的生物防治提供了可能。黄绿绿僵菌属于丝孢纲绿僵菌属,能寄生直翅目、同翅目等多个目的昆虫,英国致力于将该菌发展为杀虫剂在西非治蝗(蒲蛰龙和李增智,1996)。目前,Geng 和 Zhang(2004) 从广东省稻田自然感病褐飞虱虫尸上分离、鉴定得到黄绿绿僵菌菌株,并利用该菌株对褐飞虱进行生物测定,结

* 资助项目:公益性行业(农业)科研专项(200803003)。
** E-mail: sj412bq@163.com
*** 通讯作者,E-mail: hf.lin@163.com
收稿日期:2011-08-09,接受日期:2011-08-25

果表明对成虫和若虫都有较高的致病力,同时用黄绿绿僵菌孢子外包植物油层制成可控制褐飞虱种群数量效果较好的真菌乳悬剂。但对黄绿绿僵菌对褐飞虱致病机理及入侵机理方面的相关研究报道还未见到。现代扫描电镜技术能够对材料表面微区进行定性定量分析,使我们能够观察材料表面的细微形貌及内部组织特征,得到许多充满信息的清晰图像。

本实验从褐飞虱罹病虫体分离到 1 株对褐飞虱毒力较高的黄绿绿僵菌 Mf82 菌株,经生物测定表明对褐飞虱的致病死亡率可达 80% 以上(已另文发表)。通过对侵染过程的定期取样,利用扫描电镜观察了该菌株的分生孢子在褐飞虱虫体的附着部位,孢子萌发,侵入时间和侵入行为,为揭示黄绿绿僵菌侵染褐飞虱的途径、过程及机理研究提供直观的依据。

1　材料与方法

1.1　供试菌株和寄主昆虫

供试菌株是从褐飞虱罹病虫体分离到 1 株对褐飞虱较高毒力的黄绿绿僵菌 Mf82 菌株,保存于安徽农业大学昆虫病理实验室。在 SDAY 斜面上接种分离菌株并培养 10 d 左右,置于 4℃ 冰箱中保存,供试验所用。

供试褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål) 采自霍邱县田间,在安徽农业大学植保学院智能人工气候培养室内繁殖 10 代以上,选取发育状况一致的褐飞虱成虫作为接菌对象。

1.2　黄绿绿僵菌孢子悬浮液的配制

将保存在冰箱中的供试菌株转接到 SDAY 平板培养基上,(25 ± 1) ℃、无光条件下培养 10 d,待真菌充分产孢后,用灭菌的接种环轻轻将该菌株的分生孢子粉刮到分别盛 5 mL 0.05% Tween – 80 湿润剂的三角瓶中,在涡旋混合器上充分振荡 30 min,待链状分生孢子断裂和分散后,用双层无菌纱布过滤菌液,获得孢子悬浮液母液。用血球计数器计数每毫升母液的分生孢子含量,然后按比例稀释,配制成 1.0×10^8 个孢子/mL 浓度的供试孢子悬浮液。

1.3　褐飞虱接菌方法

用灭菌的吸虫器从人工气候室饲养的褐飞虱中采集大小一致的褐飞虱成虫 40 只,迅速放入 4 个有稻苗的 200 mL 烧杯中,每个烧杯 10 只褐飞虱成虫,用手动喷雾器将菌液均匀喷于其中 3 个烧杯里的供试虫体,另一个烧杯作为空白对照,只用 0.05% Tween 80 的水溶液处理。喷施时在其中放置三块盖玻片(1.5 mm × 15 mm)收集孢子,镜检 5 个视野(0.785 mm^2/视野,5 点取样)并计数孢子数,以确定褐飞虱实际接收的剂量(孢子/mm^2)。用医用纱布将烧杯口封住,既透气又可防止褐飞虱逃逸。将处理的褐飞虱置于 25℃、相对湿度 85% 的恒温培养箱中饲养,死亡的褐飞虱放入带有无菌滤纸的培养皿(d = 9 cm)中保湿培养。

1.4　黄绿绿僵菌侵染褐飞虱后的样品处理

真菌侵染卵巢中卵块: 用吸虫器采集即将产卵的褐飞虱 10 只,按照 1.3 接菌方法接菌并培养 4 d,待菌丝在褐飞虱体表大量生长,用无菌昆虫解剖刀在无菌操作台解剖感染黄绿绿僵菌的褐飞虱腹部,得到卵块后在型号为 Nikon-DSS230 解剖镜下观察是否有菌丝。若有,再把样品置于无菌培养皿,在 25℃ 和 RH 85% 条件下培养 48 h。

真菌侵染褐飞虱体内组织: 样品处理方法同上。

1.5　黄绿绿僵菌扫描电镜样品制备

按感染黄绿绿僵菌的褐飞虱虫体表面、褐飞虱腹部(纵切)和体内卵块 3 种部位分别取样,样品先用 3% 戊二醛隔夜固定 12 h 后,再用锇酸固定 12 h,然后用磷酸缓冲液浸洗 3 次,30 min/次;用 50%,70%,80%,90%,100% 乙醇,逐级梯度脱水,每级 12 h(Becnel,1997),其中 100% 乙醇脱水 2 次。用醋酸异戊酯置换 2 次,每次停留 30 min。样品置于室温下自然干燥后,用导电胶将样品粘于扫描电镜样品台上,然后经离子溅射法喷金(李庚午,1994)。在 TM-1000 HICHMI 型扫描电子显微镜下进行观察并拍照。

2　结果与分析

2.1　分生孢子在褐飞虱体表的侵染过程

在喷菌的褐飞虱虫体表面,黄绿绿僵菌分生孢子多分布在其节间膜、体壁的褶皱凹陷等部位(图 1: B)。在褐飞虱体表的较光滑部位,附着的孢子较少。分生孢子附着体表后,利用体表的营养物质萌发产生芽管,在未找到侵入点时可以形成菌丝在体表横向生长(图 1: C),在体表较薄弱

部位(如节间膜等、气门)形成钉状结构,穿透褐飞虱表皮,在穿透部位有凹陷,这是菌丝在穿透表皮过程中受到机械作用和酶的作用形成的。菌丝在穿透表皮后 72 h 后,可发现虫体表面布满菌丝,其中虫体腹板的菌丝量明显多于背板。说明芽管穿透未骨化的膜质区较穿透骨化的表皮要容易得多。菌丝末端形成产孢结构,产生大量分生孢子(图 1: D)。黄绿绿僵菌分生孢子侵染褐飞虱过程包括分生孢子附着、孢子萌发、穿透表皮、菌丝在寄主体内生长、侵入所有组织器官、菌丝穿出表皮、产生分生孢子,完成在褐飞虱体表的生活史。黄绿绿僵菌在褐飞虱体表产生的分生孢子成熟后扩散并继续侵染其它寄主,形成再侵染。而对照处理的虫体完整,见不到菌丝(图 1: A)。

将感病褐飞虱虫体解剖后继续在 25℃和 RH 85% 条件下培养 48 h,发现黄绿绿僵菌分生孢子一旦成功侵入褐飞虱体内,菌丝利用其体内营养迅速增殖并布满褐飞虱整个体腔和体内所有器官(图 2: A),黄绿绿僵菌不仅能侵染褐飞虱组织和器官,还能直接侵染体内卵块(图 2: B)。被侵染的香蕉形卵块的颜色由原来的光滑透明为橘黄色,表面缩水褶皱。卵块表面有孔洞,为菌丝从内部长出所致。虫体内和卵块上的菌丝虽然被体液包裹,但仍能继续生长,后期能产孢(图 2),说明菌丝够具有很强的生长能力,生长后自然断开的菌丝碎片都能形成新的生长点,并开始产生一个新的个体,继续生长。这也进一步证明真菌侵入表皮进入血腔之后,形成菌丝颗粒体进入随血液

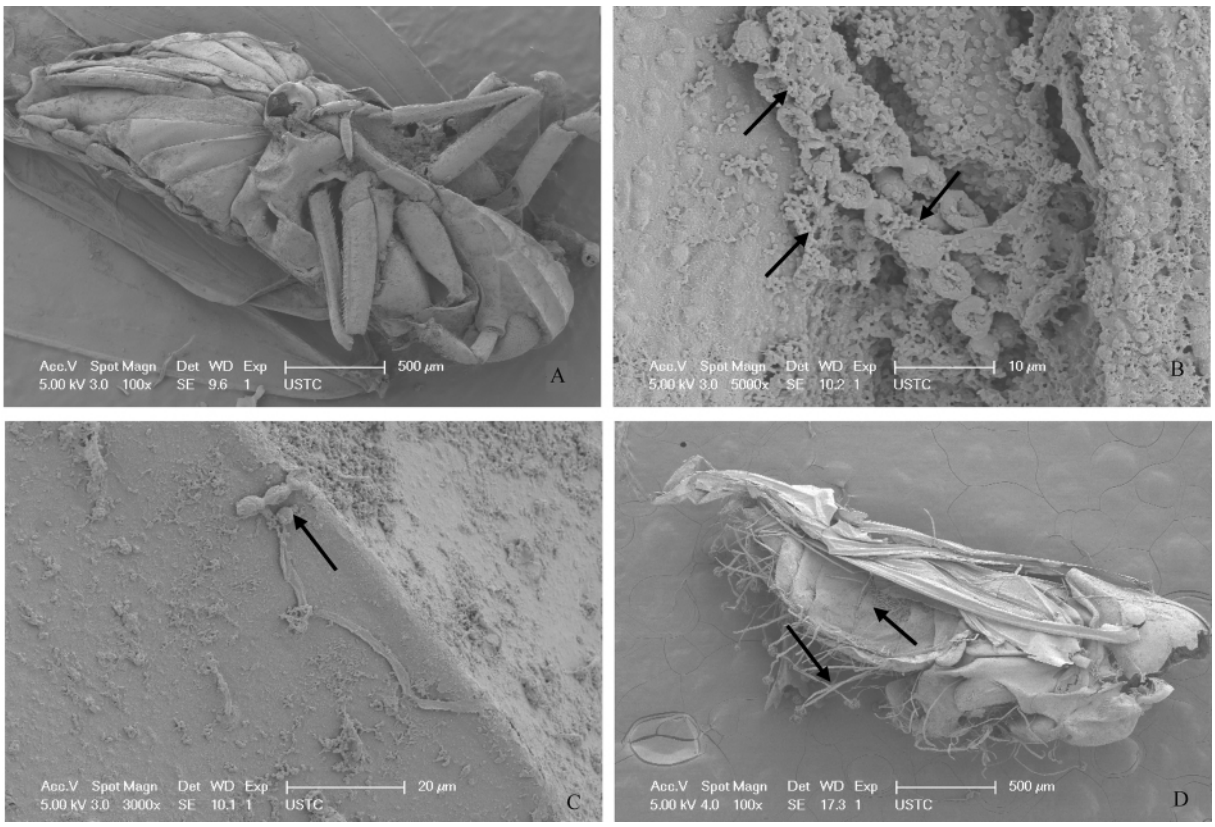

图 1 黄绿绿僵菌分生孢子在褐飞虱体表的侵染过程观察

Fig. 1 The infecti on p rocess of *Metarhizium flavoviride* conidia on the cuticle of BPH

A: 对照:褐飞虱体表 CK: Cuticle of *Nilaparvata lugens* (0 h); B: 中足基节窝 Mesocoxa cavity;
C: 腹部,孢子直接萌发入侵 Penetration of germinated conidia on the abdomen (24 h);
D: 菌丝在体表产孢 Production of conidia on cuticle (72 h).

2.2 分生孢子侵染褐飞虱体内组织和体内卵块的观察

循环进入各组织器官内部,并在其中大量增殖,侵染后期,寄主体内的水分和组织器官都能作为真

菌的营养被利用,变成菌体,而寄主则由于失水而变为干硬的僵虫,这些僵虫又在自然生态环境中又可作为再侵染的菌源。

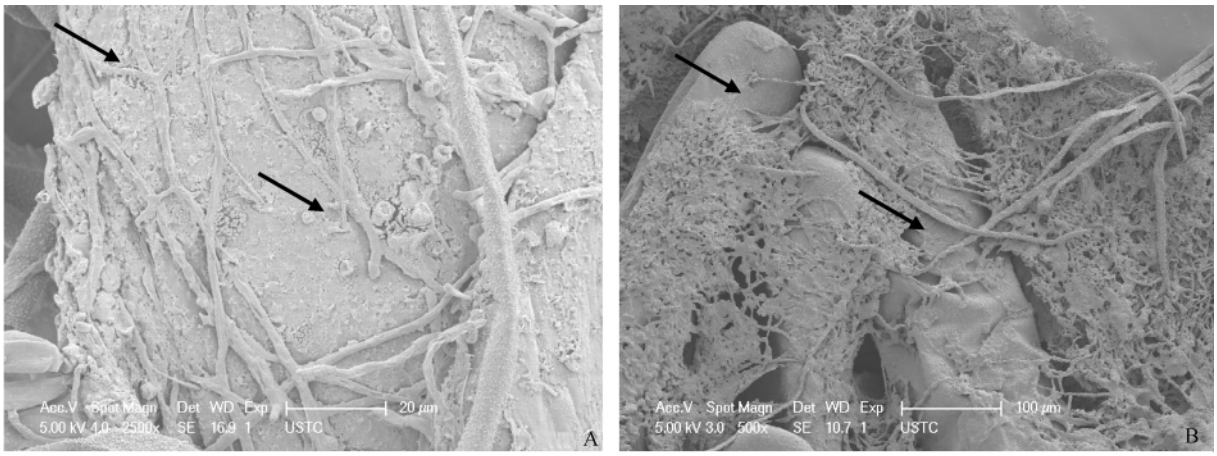

图 2　黄绿绿僵菌分生孢子侵染褐飞虱体内组织和体内卵块的观察

Fig. 2　Invasive body and eggs of *Metarhizium flavoviride* conidia on the internal BPH

A: **腹部内部菌丝** Invasive hyphae in abdomen; B: **菌丝侵染卵块** Invasive hyphae on eggs.

3　讨论

真菌的分生孢子与寄主昆虫建立寄生关系的前提是能成功附着于寄主昆虫的表皮,该过程是被动的和机械的,即分生孢子附着于寄主昆虫表皮后不一定能建立寄生关系,还必须识别表皮营养适合其寄生及寄主体表细菌等物质的抑制作用(Smith *et al.*, 1981; Lord and Howard, 2004; Maketon *et al.*,2007),这是病原真菌能否成功地侵染寄主和完成在寄主上整个生活史的关键。分生孢子在充足的养分、适宜的温度和湿度等环境条件下萌发后形成芽管和附着胞,附着胞粘贴在寄主表面并形成具有穿刺作用的结构,它可以沿气孔开口处或直接刺透寄主表皮进入寄主内部(Hajek and Leger,1994; 林华峰等,1998; 王海川和尤民生, 1999),在侵入进程中产生的特殊结构,如芽管、附着胞、穿刺时的钉状结构,在本试验中都已观察到。同时能观察到在菌丝穿透表皮过程中,菌丝以机械压力使前方表皮片层结构发生了向内弯曲变形,在菌丝的酶作用下,水解寄主表皮,在侵染处菌丝周围形成凹陷和孔洞。侵入初期阶段的动力,现在多认为是菌丝穿透表皮是通过机械压力和酶降解寄主表皮联合作用完成的(翟锦彬和黄秀梨,1997; 林华峰等,1998; 马新颖等,2000)。电镜观察还发现在穿透菌丝周围表皮上常有电子致密度高的颗粒聚集,可能是褐飞虱对黄绿绿僵菌菌丝穿透的一种表皮防御反应。

真菌侵染寄主卵块的相关报道还较少,据 Toledo 等(2010)报道,白僵菌和绿僵菌侵染蜡蝉雌成虫后,48 h 后电镜观察发现,其体内组织包括卵巢管和卵母细胞均有菌丝体。本实验利用电镜进一步观察到黄绿绿僵菌能直接侵染褐飞虱体内的卵块,能有效地利用卵块内的营养,快速地从卵块上长出菌丝,被侵染的体内卵块颜色发暗,已失去原有的生命活性,不论是否产出虫体,都不能发育成新的害虫个体,这对于自然条件下,抑制田间害虫种群数量有重要意义。值得一提的是,在盆栽喷菌试验中,我们还意外发现黄绿绿僵菌能直接感染稻株上的卵块,并从产卵痕处长出茂密的白色菌丝,而解剖卵块后镜下可见卵已变色死亡(已另文待发表),与褐飞虱体内卵块被侵染的症状基本一致。黄绿绿僵菌能直接感染稻株上的褐飞虱卵块和成虫体内卵块,大量杀死卵块,必将有效地控制下一代的虫量,这在害虫生物防治方面或许更显其应用价值,因为相对活动的虫态来说,真菌对静止的虫态作用时间会更长,作用成功机率会更大。

本文通过体表及体内的侵染过程,可直观地表现黄绿绿僵菌对褐飞虱的侵染能力和侵入方式,为评价该菌的杀虫作用和应用前景提供了证据。

参考文献(References)

Becnel JJ, 1997. Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press. 337—352.

程家安, 祝增荣, 2006. 2005 年长江流域稻区褐飞虱暴发成灾原因分析. 植物保护, 32(3):1-4.

Geng BW, Zhang RJ, 2004. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* var. *acridu* to the deveolpmental stages of brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål) and *Sogatella furcifera* (Horváth). *Insect Science*, 11(2):89—97.

季香云, 杨长举, 2003. 白僵菌的致病性与应用. 中国生物防治, 19(2):82—85.

Hajek AK, Leger RJ, 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annu. Rev. Entomol.*, 39(1):293—322.

李庚午, 1994. 不同固定剂对扫描电镜生物制样效果的探讨. 河南师范大学学报, 22(1):69—72.

林华峰, 黄 勃, 李增智, 胡萃, 1998. 白僵菌在松毛虫体上宿存侵染的电镜扫描观察. 菌物系统, 17(4):342—347.

Liu Z, Lei ZR, Hua BZ, Wang HH, Liu TX, 2010. Germination behavior of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) nymphs. *J. Entomol. Sci.*, 45(4):323—334.

Lord JC, Howard RW, 2004. A proposed role for the cuticular fatty amides of *Liposcelis bostrychophila* (Psocoptera: Liposcelidae) in preventing adhesion of entomopathogenic fungi with dry-conidia. *Mycopathologia*, 158(2):211—217.

马新颖, 陈雪芬, 金建忠, 2000. 粉虱拟青霉对黑刺粉虱的侵染过程. 中国病毒学, 15(S1):145—147.

Maketon M, Sawangwan P, Sawatwarakul W, 2007. Laboratory study on the efficacy of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hyphomycetes) in controlling *Coptotermes gestroi* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Entomologia Generalis*, 30(3):203—218.

蒲蛰龙, 李增智, 1996. 昆虫真菌学. 安徽: 安徽科学技术版社. 323—326.

Smith RJ, Pekrul S, Grula EA, 1981. Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of the corn earworm (*Heliotis zea*). *J. Invertebr. Pathol.*, 38(3):335—344.

Toledo AV, Remes Lenicov AMM, López Lastra CC, 2010. Histopathology caused by the entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, in the adult planthopper, *Peregrinus maidis*, a maize virus vector. *Journal of Insect Science*, 10(35):1—10.

王海川, 尤民生, 1999. 绿僵菌对昆虫的入侵机理. 微生物学通报, 26(1):71—73.

翟锦彬, 黄秀梨, 1997. 球孢白僵菌在棉铃虫表皮上萌发的研究. 微生物学报, 37(2):154—158.

研究论文

甘蓝夜蛾两种不同类型几丁质脱乙酰基酶基因的克隆与组织特异性表达*

姚 磊** 樊 东*** 王晓云 高艳玲

(东北农业大学农学院 哈尔滨 150030)

摘 要 几丁质脱乙酰基酶(chitin deacetylase,CDA)是昆虫几丁质降解酶中的一种酶,可以将几丁质转化为壳聚糖,在昆虫几丁质代谢中具有重要作用。本研究以甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* 5 龄幼虫虫体为材料提取总 RNA,利用 RT-PCR 和 RACE 技术,分别扩增得到甘蓝夜蛾的 2 类不同几丁质脱乙酰基酶基因的 cDNA 序列。其中一种 CDA 含有 2 036 个碱基,包括一个 1 617 个碱基的开放读码框,编码一个含 539 个氨基酸的蛋白,分子量约为 61.5 ku,作者定义其为 cDNA 1;另一种 CDA 含有 1 312 个碱基,包括一个 1 173 个碱基的开放阅读框,编码一个含 390 个氨基酸的蛋白,分子量约为 44.1 ku,作者定义其为 cDNA 2。cDNA 1 推导的氨基酸序列具有几丁质脱乙酰基酶典型的 3 个功能区,分别是几丁质结合区、催化区和低密度脂蛋白受体区,属于 CDA 第 1 组的成员。cDNA 2 推导的氨基酸序列只有几丁质催化区,属于 CDA 第 5 组的成员。利用 RT-PCR 进行该基因的 mRNA 水平上的表达表明几丁质脱乙酰基酶 cDNA 1 在幼虫取食期的唾腺、中肠、脂肪体组织表达,在体壁和马氏管中不表达,在预蛹期和蛹期表达;cDNA 2 只在幼虫期的中肠表达,在其他组织及时期都不表达。获得的基因 cDNA 序列已经登录 GenBank 并获得登录号,cDNA 1 登录号为 HQ680620,cDNA 2 登录号为 HQ680621。

关键词 甘蓝夜蛾,几丁质脱乙酰基酶,克隆,序列分析,组织表达

Molecular cloning and tissue-specific expression of two different chitin deacetylase cDNA sequences from *Mamestra brassicae*

YAO Lei** FAN Dong*** WANG Xiao-Yun GAO Yan-Ling

(Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract Chitin deacetylase (CDA) is a kind of chitin-degrading enzyme found in insects that can turn chitin into chitosan and plays an important role in insects' chitin metabolism. Total RNA was isolated from the fifth instar larvae of *Mamestra brassicae*. Two CDA cDNA sequences were cloned by RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE). One cDNA sequence was 2 036 base pairs in length and contained an open reading frame of 1 617 base pairs coding for a polypeptide of 539 amino acid residues with a predicted molecular weight of 61.5 ku. This cDNA sequence was designated as cDNA 1. The other cDNA sequence was 1 312 base pairs in length and contained an open reading frame of 1 173 base pairs coding for a polypeptide of 390 amino acid residues with a predicted molecular weight of 44.1 ku. This cDNA sequence was designated as cDNA 2. The deduced amino acid sequence of cDNA 1 contained a polysaccharide deacetylase domain, a chitin-binding peritrophin-A domain (ChBD) and a low-density lipoprotein receptor class A domain (LDLa). This sequence was a member of chitin deacetylase group I. The deduced amino acid sequence of cDNA 2 only contained a polysaccharide deacetylase domain. This sequence was a member of Chitin deacetylase group V. These two CDAs belong to two different CDA groups. Transcript analysis on two CDA sequences during various developmental stages and in

* 资助项目:黑龙江省博士后科研启动金(LBH-Q09171)、哈尔滨市科技创新人才研究专项资金项目(RC2006QN002027)。

** E-mail: yaolei22619@163.com

*** 通讯作者,E-mail: dnfd@163.com

收稿日期:2010-12-08,接受日期:2011-03-25