

玫烟色棒束孢侵染小菜蛾的透射电镜观察^{*}

雷妍圆^{1 3 **} 何余容^{1 ***} 吕利华²

(1. 华南农业大学资源环境学院 广州 510642; 2. 广东省农业科学院植物保护研究所 广州 510640;

3. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所 北京 100081)

摘 要 利用透射电镜观察了玫烟色棒束孢 *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) 对小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 的侵染过程及菌体在虫体内的增殖方式。以浓度为 1×10^7 孢子/mL 的孢子悬浮液接种小菜蛾 4 龄幼虫, 在透射电镜下对虫体各部位的观察结果表明: 接种后 1 h 玫烟色棒束孢菌株 EBCL 03011 的分生孢子开始萌芽, 至 4 h 可观察到附着孢的形成和穿透, 接种后 24 h 已普遍侵入体腔。玫烟色棒束孢在寄主表皮和体腔内, 以菌丝段出芽生殖、菌丝分隔及菌丝段分隔 3 种方式大量增殖, 主要以颗粒状的菌丝段在寄主体腔内扩散, 菌丝段在穿透表皮和体腔内增殖过程中伴随着机械压力和酶的活动。

关键词 小菜蛾, 玫烟色棒束孢, 侵染过程, 增殖方式, 透射电镜

Observation of infection process of *Isaria fumosorosea* to *Plutella xylostella* with transmission electron microscopy

LEI Yan-Yuan^{1 3 **} HE Yu-Rong^{1 ***} LV Li-Hua²

(1. College of Natural Resources and Environment, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China;

2. Institute of Plant Protection, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China;

3. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract To demonstrate the process of infection of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) by the indigenous strain EBCL 03011 of the fungus *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) (Hypocreales: Cordycipitaceae) 4th instar larvae of *P. xylostella* were experimentally infected with a fungal suspension (1×10^7 conidia/mL) and organs such as the integument, mid-gut and muscle tissues subsequently examined by transmission electron microscopy. Histopathological analyses revealed that conidia of *I. fumosorosea* germinated 1 h post-inoculation resulting in appressorium formation ultimately penetrating the integument of *P. xylostella* 4 h after inoculation. The hyphal bodies had spread into the body cavity 24 h after inoculation. The penetrating hyphae of *I. fumosorosea* produced a number of granular hyphal bodies by budding or septation, and became distributed throughout the cuticle and hemocoel of the infected larvae. The penetration and propagation of the hyphal bodies was achieved by a combination of mechanical pressure and enzymatic action during the infection process.

Key words *Plutella xylostella*, *Isaria fumosorosea*, infection process, propagation ways, transmission electron microscopy

小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 是一种世界性的十字花科蔬菜主要害虫。由于长期使用广谱性杀虫剂, 严重污染了自然生态环境和农林牧产品, 不但杀伤大量有益的天敌昆虫, 而且造成小菜蛾

对大约 50 多种杀虫剂均产生了严重的抗性(吴敏等 2005)。寻求安全友好且可持续性的防治技术成为市场的迫切需求, 应用虫生真菌对虫害进行生物防治就是有效手段之一 (Weinberger and

* 资助项目: 公益性行业(农业)科研专项(201103025)、广东省农业攻关项目(2006B20301037)。

** E-mail: leiyanyuan@163.com

*** 通讯作者, E-mail: yrhe@scau.edu.cn

收稿日期: 2010-11-09, 接受日期: 2011-02-16

Srinivasan, 2009; Grzywacz *et al.*, 2010)。

玫烟色棒束孢 *Isaria fumosorosea* 是一种可侵染并致死小菜蛾的虫生真菌,随着人们对其生物学、分类、生化和应用方面研究的日益增多,用玫烟色棒束孢防治小菜蛾成为近年来一个新的研究热点(Wraigh *et al.*, 2000; Altre and Vandenberg, 2001; Indiragandhi *et al.*, 2007)。关于该菌对寄主昆虫入侵机制方面的研究不多。张兔等(2007)对感染玫烟色棒束孢的菜青虫幼虫组织病理变化进行了研究。王宏民等(2009)用扫描电镜观察了不同接种方式下玫烟色棒束孢对小菜蛾幼虫入侵速度的差异,虽涉及玫烟色棒束孢对小菜蛾侵染机制的研究,但分生孢子在小菜蛾体内的侵染过程和增殖行为未见有报道,玫烟色棒束孢在寄主体内的生长和增殖方式尚不明确。此前吕利华等(2007)曾报道过一株高致病力玫烟色棒束孢 SCAU-PFCF01,其对小菜蛾 2 龄幼虫的致死中时(LT_{50})为 1.66 d,致死中浓度(LC_{50})为 1.17×10^4 孢子/mL,致死速度之快至今国内外鲜见报道。为了探明该菌高致病力的原因,有必要对这株玫烟色棒束孢在小菜蛾体内的侵染行为进行观察,了解玫烟色棒束孢在小菜蛾体内的入侵和增殖行为。

作者利用透射电镜对这株高致病力菌株 SCAU-PFCF01(即本文的 EBCL 03011 菌株)在小菜蛾体内的侵染行为进行了超微结构观察,以摸清玫烟色棒束孢在寄主体内的侵染及增殖规律,探索玫烟色棒束孢对小菜蛾的致病机理,从而为进一步提高小菜蛾生物防治效果提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

小菜蛾是华南农业大学资源环境学院天敌昆虫实验室人工饲养多代的室内种群,室内温度控制为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,相对湿度 60% ~ 90%,光照条件 L:D = 14:10,幼虫长至 4 龄初供试。

1.2 供试菌株

供试玫烟色棒束孢菌株 EBCL 03011 来源于广东家白蚁 *Coptotermes formosanus* Shiraki 染菌尸体,菌种于华南农业大学昆虫生态室 -80°C 下保藏。菌株在萨氏培养基 SDAY(葡萄糖 40 g,蛋白胨 10 g,酵母膏 10 g,琼脂 15 ~ 20 g,蒸馏水 1 L)平

板上 25°C ,无光照条件下培养 20 d 后供试。

1.3 接种及取样方法

用接种环将分生孢子粉轻轻刷入装有灭菌的 0.05% tween-80 液的 50 mL 烧杯中,经涡流振荡,点样血球计数板,制成浓度为 1×10^7 孢子/mL 的孢子悬浮液,用软毛笔将供试幼虫挑入孢子悬浮液中,浸渍 10 s 后挑出,将幼虫置于滤纸上吸去多余水分后移至新鲜甘蓝叶片上,放入皿底垫有湿润滤纸片的直径 9 cm 的培养皿中,培养皿用保鲜膜封口保湿,封口处用针扎数孔以通风透气。幼虫接种后放在 25°C ,L:D = 14:10 的人工智能箱中饲养。分别于不同时间取样,取样时间为接种后 1、4、8、16、24、36 和 48 h。

1.4 透射电镜样品制备及观察

样品用 3% 戊二醛前固定 4 h 以上,0.1 M PH 7.0 磷酸缓冲液冲洗 30 min,1% 锇酸后固定 1 h,0.1 M PH 7.0 磷酸缓冲液冲洗 30 min。50% ~ 100% 系列酒精逐级脱水,每级脱水 10 min,环氧丙烷过渡 30 min。国产 618 环氧树脂浸透、包埋、聚合。瑞典 LKB III 型超薄切片机对虫体纵向切片,醋酸铀、柠檬酸铅双染色,TECNAI-10 型透射电镜观察玫烟色棒束孢对小菜蛾的侵染进程和菌体增殖形态并拍照。

2 结果与分析

透射电镜观察结果(图 1)显示,接种后 4 h 内,为分生孢子在幼虫体表的萌发和穿透阶段。接种后 1 h,菌株 EBCL 03011 的分生孢子已开始萌芽(图 1:a)。至接种后 4 h,可看到分生孢子萌发生产生附着胞牢固附着于寄主表皮上(图 1:b),此时的分生孢子内,液泡偏向产生附着胞的一端(图 1:c),以促使附着胞的产生和向表皮入侵。在超薄切片中首次观察到菌体穿透到寄主表皮层中,侵染钉在表皮上的入侵点出现着色较深的区域(图 1:d),很可能是分生孢子在入侵穿过程分泌出了某种活性物质。

接种后 8 ~ 16 h,为菌体在表皮层的穿透和增殖阶段。侵入到表皮层的穿透菌丝很快产生大小、形状不同的小型颗粒状菌丝段(图 1:e)和长丝状菌丝段(图 1:f)。长丝状菌丝段的两端着色较深,与细胞质在两端的集中有关,菌丝段朝两端反向的不断伸长形成菌丝,因而在形态上比颗粒

状菌丝段长。至接种后 12 h, 穿透已较为普遍, 位于表皮层的穿透菌丝段在菌丝末端侧向伸出芽管(图 1:g), 在菌丝段附近, 寄主表皮层的片层结构发生变形, 呈波浪起伏状(图 1:h), 说明穿透行为还涉及机械力的作用。长丝状菌丝段在表皮层内平行于片层结构延伸, 菌丝段无隔或有 1 个隔, 使表皮层片层结构完全被打乱, 极大地破坏了表皮层的固有结构。菌丝段周围特别是前端出现电子密度很低的光晕, 光晕区片层结构消失, 这一现象说明穿透过程伴随着组织溶解(图 1:i)。经一定时间后, 在其机械力的作用下表皮层和皮细胞层发生分离。至 16 h, 表皮中可观察到的菌丝段的产生有 3 种方式: 菌丝出芽生殖、菌丝分隔及菌丝段本身直接分隔增殖, 其中以第 3 种增殖方式最为普遍, 增殖中的菌丝段其内含大量线粒体和脂质体, 表明其代谢活动旺盛(图 1:j)。

接种后 24 h, 为菌体在血腔内的增殖阶段。此时观察到位于皮细胞层的菌丝段端部侧向向肌肉组织穿透, 使皮细胞层与肌肉组织分离(图 1:k), 刚进入血腔的少量菌丝段被血细胞包围, 血细胞在菌丝段附近聚集(图 1:l), 体腔内的菌丝段在刚形成时无明显的液泡, 随时间增加及增殖活动的进行才出现明显的液泡(图 1:m), 液泡内有一些管状内含物和脂质体。菌丝段前端出现电子密度很低的光晕, 光晕区组织裂解消失, 说明其在体腔内增殖过程中也伴随着活性物质的分泌和组织溶解。随着侵入菌丝段数量的增多, 血细胞无法抵挡使菌丝段得以在血腔内大量增殖。在接种后 36 h, 除了颗粒状菌丝段外, 体腔内还可观察到较多的长丝状菌丝(图 1:n), 寄主的器官和组织趋于解体。体内大量繁殖产生的菌丝段开始由腔内向体外穿透(图 1:o), 至 48 h, 寄主已经死亡, 菌丝段成功突出体表向体外生长(图 1:p)。

3 讨论

虫生真菌萌发和形成附着孢穿透昆虫体壁是侵染寄主的第一步, 因而分生孢子在寄主体表形成附着孢的速度和数量, 是虫生真菌在体表成功定殖和致病寄主昆虫的关键环节。王音等(2006)研究表明, 绿僵菌菌株 LF68 侵染小菜蛾约在接种后 22 h 开始进入表皮。张奂等(2007)以玫烟色棒束孢菌株 PF9606 侵染菜青虫 *Pieris rapae*, 在接种后 30 h 开始产生侵染钉。本实验在接种后 1 h

即观察到玫烟色棒束孢菌株 EBCL 03011 的分生孢子萌发产生芽胞, 4 h 即观察到附着孢的形成和穿透寄主表皮层中, 至 12 h 穿透已普遍发生, 其附着孢形成和穿透速度之快鲜见报道。分生孢子接种至虫体后, 萌发产生芽管, 附着孢是在芽管的顶端形成的, 但不一定所有的芽管顶端都能形成附着孢。此前作者对玫烟色棒束孢侵染小菜蛾的扫描电镜观察(另文发表)发现, 不同致病力菌株间萌发率和萌发速度差异不大, 但低致病力菌株无法或较少形成附着孢, 其多数分生孢子仅仅是萌芽而无法附着在寄主体壁上, 极易在寄主行动过程中脱落, 最终由于无法从寄主体壁汲取养分继续生长而自我凋亡, 因而致病寄主的能力弱。与以往报道的致病小菜蛾的虫生真菌相比, 菌株 EBCL 03011 对小菜蛾具有更快的侵染速度, 可以认为其迅速致死小菜蛾的能力与侵染速度有关, 该菌对其他昆虫致病力的强弱和致病速度还在进一步研究中。

一般来说, 虫生真菌通过分生孢子产生附着孢附着在寄主体壁的同时, 还分泌出各种胞外酶加速寄主表皮的降解以协助菌体的穿透行为, 因而虫生真菌是在机械压力和酶降解的联合作用下穿透寄主昆虫表皮(Goettel *et al.*, 1989; 王海川和尤民生, 1999; 田志来等, 2008), 但这仅仅是完成了入侵的第一步。虫生真菌从寄主体表入侵继而在体内定殖的过程, 涉及附着孢形成、体壁穿透及抵抗昆虫宿主免疫功能等多个连续环节, 包括分生孢子在体壁上的粘附、萌发、穿透、体内发育和致死等一系列步骤, 是附着孢、表皮降解酶和毒素(能够产生毒素的真菌)等机械力和生理生化作用的综合结果。以往的报道一直未见玫烟色棒束孢在小菜蛾体内超微结构的研究, 不了解菌体进入体内之后的生长和增殖情况。本研究发现感菌小菜蛾幼虫表皮层和体腔内增殖的菌丝段周围组织被溶解, 证实了玫烟色棒束孢在小菜蛾体内侵染的过程中有酶活动的存在。观察到穿透的菌丝段使寄主表皮片层结构发生扭曲变形, 使肌肉和表皮分离, 亦证实了侵染过程中还存在着机械压力作用。说明玫烟色棒束孢在分生孢子附着、开始穿透、穿透后和体内增殖的过程中伴随着机械压力和酶的活动, 菌体不仅在入侵初期能对寄主表皮进行局部酶解, 实现对寄主的成功入侵, 还能在寄主体内增殖过程中分泌活性物质降解体内的

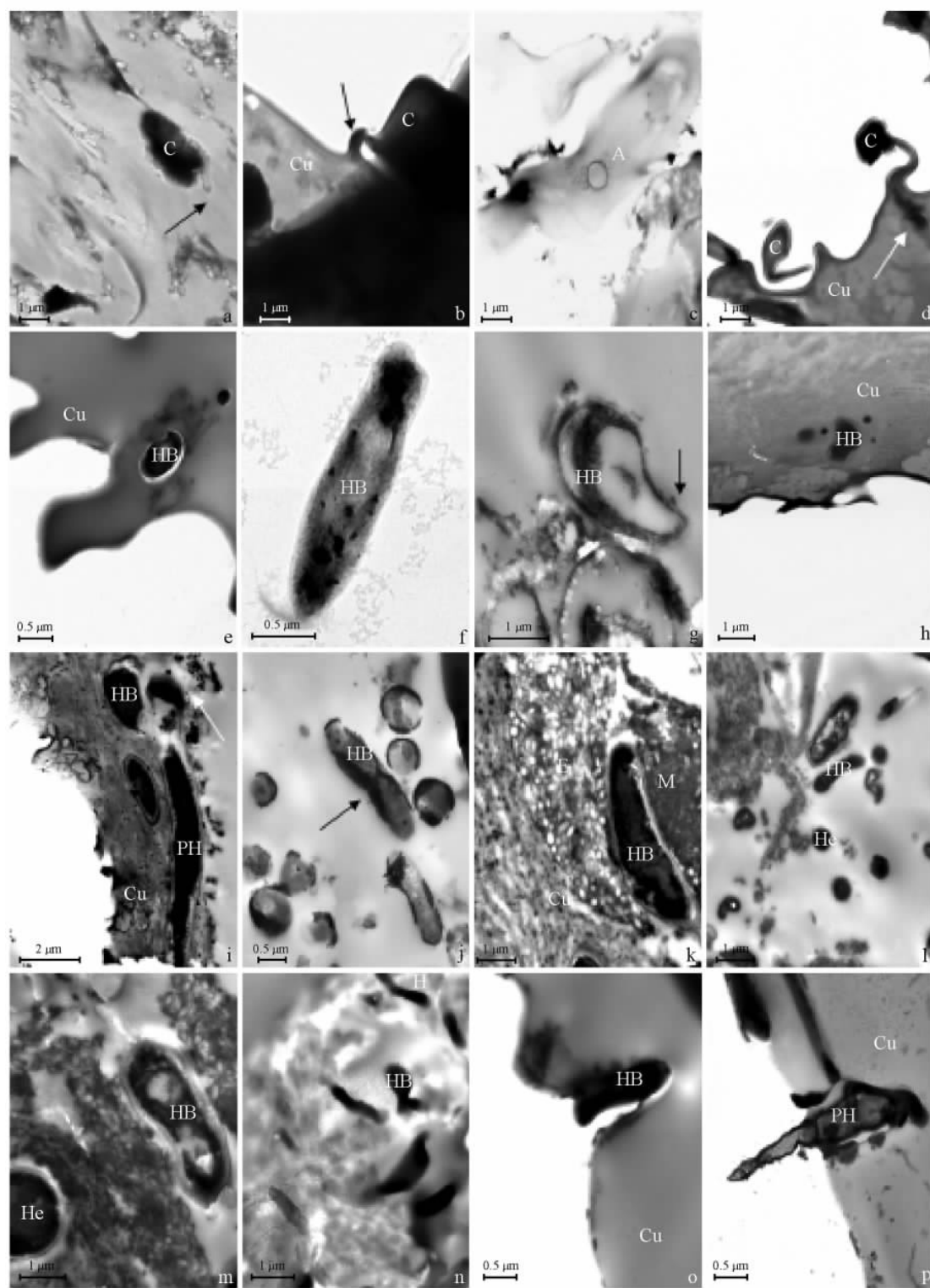


图1 玫烟色棒束孢入侵小菜蛾的透射电镜观察

Fig.1 Observation of infection process of *Isaria fumosorosea* on *Plutella xylostella* with transmission electron microscopy

a:芽管(箭头处)(1 h);b:分生孢子附着于(箭头处)寄主表皮(4 h);c:附着孢(4 h);d:穿透点的活性物质(箭头处)(4 h);e:颗粒状菌丝段(8 h);f:长丝状菌丝段(8 h);g:菌丝段的出芽方式增殖(箭头处)(12 h);h:表皮片层内的菌丝段

(12 h); i: 菌丝前端(箭头处)出现电子密度很低的光晕(12 h); j: 表皮层内菌丝段自行分隔(箭头处)增殖(16 h); k: 皮细胞层与肌肉组织间的菌丝段(24 h); l: 血淋巴包围菌丝段(24 h); m: 体腔内菌丝段自行分隔增殖(24 h); n: 体腔内的菌丝体(36 h); o: 菌丝段由体内向体外穿透(36 h); p: 体内的菌丝段成功穿出表皮(48 h)。

a: Germ tube(at arrow) of the germinated conidia (C) (1 h); b: Conidia attached (at arrow) to the cuticle (Cu) (4 h); c: Appressorium (A) (4 h); d: Active substance appeared in the penetrant area of cuticle (at arrow) (4 h); e: Granular hyphal body(HB) (8 h); f: Filamentous hyphal body (8 h); g: Hyphal bodies developed by budding (at arrow) (12 h); h: The hyphal body in the cuticle and deformation of the lamellae (12 h); i: Clearing zones appeared (at arrow) at the top of the penetrant hyphae (PH) in the cuticle (12 h); j: Hyphal bodies developed by direct septation themselves (at arrow) and proliferated in the cuticle(16 h); k: The hyphae body in the epidermis (E) grew into muscle(M) laterally (24 h); l: The hyphal bodies were surrounded by the hemolymph (He) in the body cavity(24 h); m: Hyphal bodies of EBCL03011 ,which developed by direct septation themselves , proliferated in the body cavity(24 h); n: Hyphae in body cavity (36 h); o: Hyphal body pushing outward through cuticle (36 h); p: Hyphal penetrated cuticle successfully from the body cavity(48 h)。

组织和肌肉,这些起降解作用的活性物质是否就是毒素,是否因为菌株产生了毒素才有如此快的致病速度还不得而知,关于活性物质的成分亦有待进一步试验确定。

从本文的研究结果来看,玫烟色棒束孢主要依靠分生孢子在小菜蛾幼虫体内增殖出大量的菌丝段,尤其是颗粒状菌丝段对寄主进行侵染,其菌丝段的产生方式与绿僵菌在小菜蛾体内的增殖方式相类似(王音等,2006),包括出芽生殖、菌丝分隔及菌丝段分隔三种。试验中观察到的少量长丝状的菌丝段,其形成后不久,便自行分隔断裂成小型颗粒状菌丝段,以该形式产生更多的入侵单元,迅速布满虫体,因而颗粒状菌丝段作为玫烟色棒束孢对寄主的主要入侵形态,推测是因为小型的颗粒状菌丝段比长丝状菌丝段更易于在虫体内大量繁殖,并且可以随寄主体内血淋巴循环快速扩散至各组织器官,使侵染速度达到最快,侵染更有效率,这很可能是这株玫烟色棒束孢迅速致死寄主昆虫的一种策略。

参考文献 (References)

- Altre JA, Vandenberg JD, 2001. Factors influencing the infectivity of isolates of *Paecilomyces fumosoroseus* against diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J. Invertebr. Pathol.*, 78: 31—36.
- Goettel MS, St Leger RJ, Rizzo NW, 1989. Ultrastructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. *J. Gen. Microbiol.*, 135: 2233—2239.
- Grzywacz D, Rossbach A, Rauf A, 2010. Current control

methods for diamondback moth and other brassica insect pests and the prospects for improved management with lepidopteran-resistant Bt vegetable brassicas in Asia and Africa. *Crop Protection*, 29: 68—79.

- Indiragandhi P, Anandham R, Madhaiyan M, 2007. Cultivable bacteria associated with larval gut of prothiofos-resistant, prothiofos-susceptible and field-caught populations of diamondback moth, *Plutella xylostella* and their potential for antagonism towards entomopathogenic fungi and host insect nutrition. *J. Appl. Microbiol.*, 103: 2664—2675.
- 吕利华,何余容,武亚敬,冯夏,陈焕瑜,2007. 玫烟色棒束孢对小菜蛾致病力的时间-剂量-死亡率模型模拟. *昆虫学报* 50(6):567—573.
- 田志来,阮长春,李启云,谭云峰,孙光芝,2008. 球孢白僵菌对昆虫致病机理的研究进展. *安徽农业科学*, 36(36): 16000—16002.
- 王宏民,张奂,郝赤,王曙光,张仙红,2009. 玫烟色拟青霉对小菜蛾幼虫的侵染过程及接菌方法对其致病力的影响. *中国生态农业学报*, 17(4): 704—708.
- 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.
- 王音,雷仲仁,张青文,问锦曾,2006. 绿僵菌侵染小菜蛾幼虫过程的透射电镜观察. *昆虫学报*, 49(6): 1042—1045.
- Weinberger K, Srinivasan R, 2009. Farmers' management of cabbage and cauliflower pests in India and their approaches to crop protection. *J. Asia-Pacific Entomol.*, 12: 253—259.
- Wraigh SP, Carruthers RI, Jaronski ST, 2000. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whithfly, *Bemisia argentifolii*. *Biol. Control*, 17: 203—217.
- 吴敏,韩召军,孟建业,朱斌,2005. 南京地区小菜蛾的抗性检测及初步分析. *昆虫学报* 48(4): 633—636.
- 张奂,张仙红,张未仲,张亚丽,2007. 玫烟色拟青霉对菜青虫的侵染及致病作用. *植物保护* 33(2): 64—67.