

观察球孢白僵菌侵染烟粉虱若虫过程的新方法——荧光显微法*

王登杰^{1**} 雷仲仁¹ 王帅宇² 王海鸿^{1***}

(1. 中国农业科学院植物保护研究所/植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100192

2. 北京市植物保护站, 北京 100029)

摘要 【目的】介绍一种观察白僵菌 *Beauveria bassiana* 侵染烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius) 若虫的荧光显微方法。【方法】将被白僵菌侵染的烟粉虱若虫用荧光素二乙酸酯(FDA)染色, 并于波长为 450 ~ 490 nm 的蓝光下显微观察。【结果】在接种白僵菌 12 h 和 24 h 的烟粉虱若虫上分别观察到昆虫表皮上分生孢子的萌发和芽管穿透表皮。结合裸眼和荧光显微观察结果证实了被真菌侵染的烟粉虱若虫体色变红和菌体在虫体内增殖是同时发生的。【结论】应用荧光显微方法能观察到白僵菌在烟粉虱若虫体表和体内的侵染。

关键词 烟粉虱, 若虫, 白僵菌, 荧光显微法

A new fluorescent microscopy method for identifying *Beauveria bassiana* infected *Bemisia tabaci* nymphs

WANG Deng-Jie^{1**} LEI Zhong-Ren¹ WANG Shuai-Yu² WANG Hai-Hong^{1***}

(1 State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of

Agricultural Sciences, Beijing 100193, China 2 Beijing Plant Protection Station, Beijing 100029, China)

Abstract 【Objectives】To assess the effectiveness of a fluorescent microscopy method developed for identifying *Bemisia tabaci* (Gennadius) nymphs infected with the *Beauveria bassiana* fungi. 【Methods】Whitefly nymphs infected with the fungi were stained with fluorescent indiacetate (FDA) and microscopically observed under blue light at a wavelength of 450-490 nm. 【Results】mination of conidia on the cuticle of nymphs and penetration of the cuticle by fungal germ tubes were observed within 12 h and 24 h post-inoculation, respectively. Observation both with the naked eye and under fluorescent microscopy confirmed the concurrence of the production of red pigment and the multiplication of hyphal bodies in infected nymphs. 【Conclusion】The new method allows the process of infection of *B. tabaci* by *B. bassiana* to be observed under fluorescent microscopy and infected nymphs to be readily identified.

Key words *Bemisia tabaci*, nymph, *Beauveria bassiana*, fluorescence microscopy method

烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius) 是一种世界性害虫, 对蔬菜, 花卉, 棉花和烟草等多种经济作物造成严重为害 (Brown *et al.*, 1995)。在我国, 烟粉虱最早记录于 1949 年 (周尧, 1949), 但是并没有大规模危害成灾的报道。近

年来, 随着新的生物型, B 型和 Q 型烟粉虱的入侵和传播, 烟粉虱在我国许多地方大规模暴发并造成了严重危害 (罗晨等, 2000; Wang *et al.*, 2010)。由于烟粉虱对化学杀虫剂抗性的快速发展以及杀虫剂本身引起的环境问题 (Wang *et al.*,

* 资助项目 Supported projects: 现代农业产业技术体系 (CARS-25-B-07); 北京市科技计划课题 (Z121100001212006)

**第一作者 First author, E-mail: 576023312@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: wanghaihong2020@sina.com

收稿日期 Received: 2015-01-05, 接受日期 Accepted: 2015-01-15

2010), 利用昆虫病原真菌等生物农药已成为防治烟粉虱的重要途径(Faria and Wraight, 2001)。

球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 是一种广谱性昆虫病原真菌, 大量研究通过室内及大田试验证明了其对烟粉虱的高度侵染性(Wraight *et al.*, 1998, 2000; Liu and Stansly, 2009; Liu *et al.*, 2010)。本实验室从亚洲玉米螟上分离到 1 株对烟粉虱致病力较高的球孢白僵菌 GZGY-1-3 菌株, 在浓度为 1×10^7 孢子/mL 时, 对 4 龄若虫的侵染率为 88% (另文发表)。

虫生真菌侵染昆虫寄主涉及孢子附着于寄主体壁(张焱等, 2013)、萌发、分化产生侵染结构、菌丝穿透体壁和菌体在宿主体内增殖并引起侵染致病。每一环节都可能涉及病原菌与宿主的识别与互作, 都影响着侵染是否成功, 决定着真菌对宿主的毒力。通常情况下, 观察真菌对昆虫体表阶段的侵染是通过扫描电镜技术来实现的(王音等, 2005; Liu *et al.*, 2010), 而观察菌体在寄主体内的增殖是通过石蜡切片技术和透射电镜技术来实现的(刘召等, 2006; 王音等, 2006)。科研人员利用这些技术能清晰地观察到真菌对昆虫寄主的侵染过程, 但同时也被利用这些技术所耗费的时间, 人力和物力所困扰。

荧光素二乙酸酯(FDA)是一种无极性的酯, 能被活细胞内酯酶水解, 并被波长为 450~490 nm 的蓝光激发出亮绿色荧光(Jones and Sneft, 1985)。作者在试验过程中发现利用该荧光染料能通过较为简单的操作步骤即能清晰地观察到球孢白僵菌侵染烟粉虱若虫体表和体内的情况。因此详细描述此过程, 以期探讨白僵菌与烟粉虱之间的相互作用方式和关系, 为明确白僵菌对烟粉虱的致病机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫和真菌

本试验所用的烟粉虱于 2013 年采集于河北廊坊中国农业科学院实验基地, 寄主为番茄, 并在中国农业科学院植物保护研究所内多代饲养。饲养条件为 27℃, L12:D12。实验前, 将株高

25 cm 左右的干净番茄苗放入养虫笼中, 24 h 后取出并移除所有成虫。番茄幼苗被移到一个新的养虫笼中, 饲养条件同上, 直至卵发育为 4 龄若虫。

球孢白僵菌菌株 GZGY-1-3【保藏在中国普通微生物菌种保藏中心(CGMCC) No. 9254】在室内用萨氏培养基斜面培养获得分生孢子粉。用灭菌的 0.05%吐温-80 配置 1×10^8 的球孢白僵菌悬浮液。

1.2 荧光染料的制备

将 4 mg FDA (Sigma 化学制品公司)溶于 1 mL 丙酮制备成荧光染料贮液。放置于不透光的瓶中 4℃保存。在这样的条件下, FDA 贮液能保持反应活性最长达 6 个月(Jones and Sneft, 1985)。将 35 μ L 的 FDA 贮液溶解于 4 mL 的去离子水中制备成荧光染料工作液。每次实验的工作液要新鲜制备, 装有工作液的器皿用铝箔纸遮挡避光, 并放置于冰上使用。

1.3 烟粉虱若虫被球孢白僵菌侵染后的症状及荧光显微观察

将带有 50~100 只 4 龄若虫的番茄叶片离体, 放入白僵菌孢子悬浮液中浸泡 10 s, 取出并在室温下自然晾干。预先在培养皿(直径: 90 mm)中加入 2%的琼脂, 并铺一层滤纸。晾干的叶片放入培养皿中并用湿棉花包裹叶柄。每天定时观察烟粉虱幼虫的存活及感染情况, 记录幼虫感染前后的形态特征的变化。并将虫体保湿, 待到长出菌丝后镜检其是否为白僵菌感染。

取球孢白僵菌处理后 0、12、24、36、48、72 h 的烟粉虱若虫。观察时, 将烟粉虱若虫置于干净的载玻片上, 滴一滴荧光染料工作液, 盖上盖玻片, 在激发光 450~490 nm、蓝色滤光片的荧光显微镜(OLYMPUS, BX51) 400 倍物镜下观察。

2 结果与分析

2.1 烟粉虱若虫被球孢白僵菌侵染后的症状及荧光显微观察

白僵菌接种到烟粉虱若虫体表 0 h 后, 在体表的区域均观察到存活的孢子(图 1:A), 12 h 后, 大部分孢子(>70%)已经开始萌发,

其中约 50%孢子的芽管长度已超过孢子直径的 2 倍,约 20%的孢子仅见一侧出现一个芽状突起,说明刚刚萌芽(图 1:B)。24 h 后,萌发的芽管穿透昆虫体壁进入虫体内(图 1:C)。36 h 后,可以观察到菌丝在虫体内大量生长(图 1:D)。48 h 后,在表皮下可以清晰见到芽生孢子,说明已经开始繁殖(图 1:E)。60 h 后大部分虫体变为可用肉眼直接与健康虫体区分的红色,与 Wraight 等(1998)观察结果相吻合,但形状仍为

扁椭圆状,无明显变化,电镜观察可见到烟粉虱幼虫体表已经有菌丝伸出虫体边缘(图 1:F,G)。72 h 后,仍有少部分虫体不发红(约占 10%,这部分个体若在后期加大湿度培养仍能长出菌丝),其余个体中有的虫体红色加深为红褐色,显微观察发现菌丝遍布虫体表面(图 1:H),有的个体肉眼观察已经发白,显微观察发现产生了大量的分生孢子(图 1:I),说明在自然条件下,如果环境适宜可以再次进行侵染。

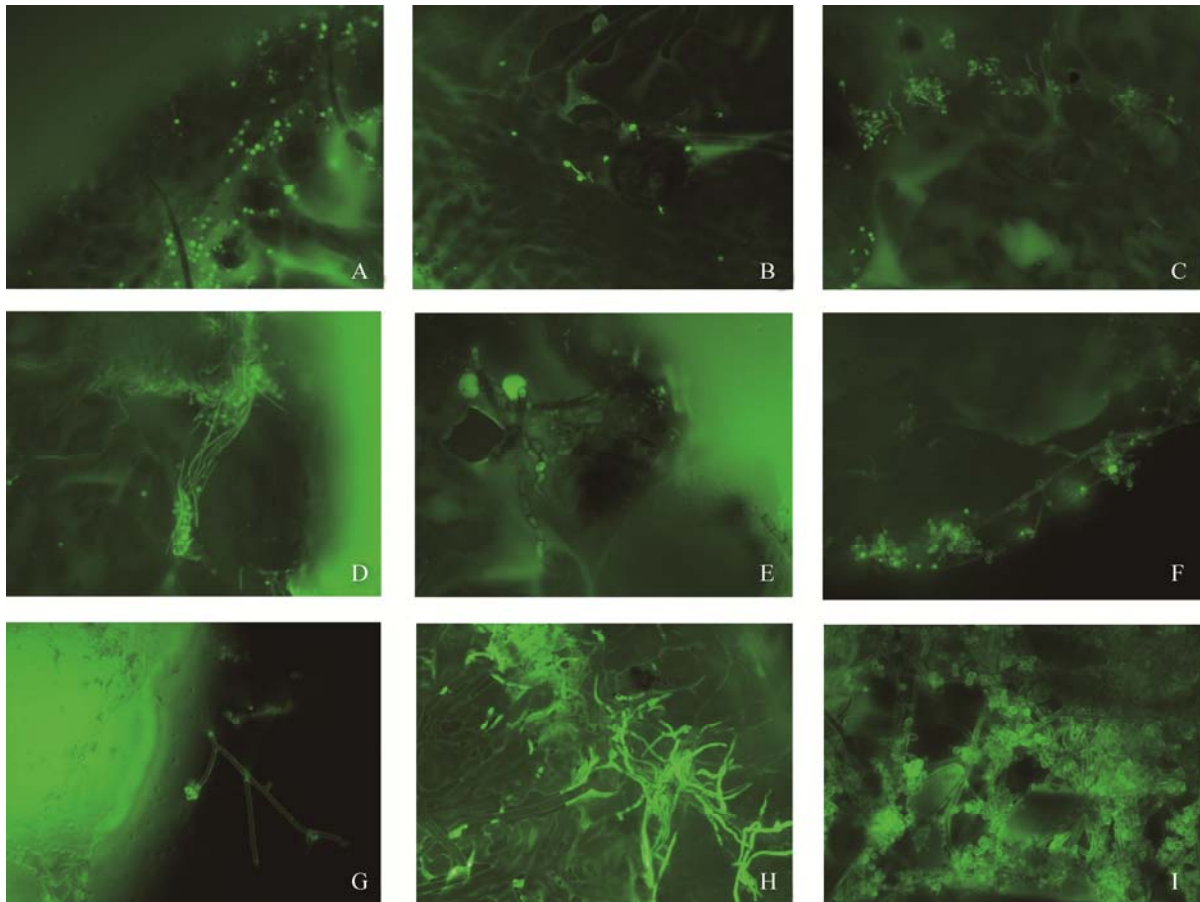


图1 球孢白僵菌侵染烟粉虱若虫的荧光显微观察

Fig. 1 Observation of *Beauveria bassiana* infecting *Bemisia tabaci* nymph under fluorescence microscope

A. 虫体表面的分生孢子(0 h); B. 真菌孢子在虫体表面附着和萌发出芽管(12 h); C. 芽管穿透体壁向虫体内生长(24 h); D. 菌丝大量增殖(36 h); E. 芽孢分化(48 h); F和G. 菌丝突出体壁向外生长(60 h); H和I. 更多菌丝在虫体表面生长并产生分生孢子(72 h)。

A. Conidia on the body surface of insect (0 h); B. Attachment and germination of conidia on the cuticle(12 h); C. Penetration of the cuticle by germ tube and the growth of hyphae within the insect body(24 h); D. Propagation of hyphae (36 h); E. Spore differentiation(48 h); F and G. Penetration of the cuticle by hyphae and growth of hyphae outside the insect body(60 h); H and I. Hyphae growth and conidia differentiation outside the insect body(72 h).

3 讨论

利用荧光素二乙酸酯 (FDA) 在激发光波长为 450~490 nm 的荧光显微镜下能清晰观察到存活的真菌孢子 (Schading *et al.*, 1995)。通过此项荧光显微技术, 可以随时检查白僵菌侵染烟粉虱若虫体表和体内的情况。与常规的扫描电镜和透射电镜技术相比, 极大地降低了时间和经济成本。

通过裸眼和荧光电镜共同观察发现, 烟粉虱若虫发生体色变化时, 菌丝在虫体内部已经大量繁殖, 虫体表面也已经遍布菌丝, 说明白僵菌在烟粉虱体内的大量增殖是导致其死亡的主要原因之一。烟粉虱发生体色改变是由于在侵染过程中真菌产生了卵孢素 (Wraight *et al.*, 1998; Vey *et al.*, 2001), 但是卵孢素的功能及其作用机理还需要进一步的研究。

在本实验中通过荧光显微技术观察到烟粉虱接种白僵菌 GZGY-1-3 菌株 12 h 后孢子就在体表附着并萌发, 表明白僵菌此时已经打破了表皮物质对白僵菌萌发的抑制作用 (James *et al.*, 2003), 成功地附着于体表; 24 h 后芽管穿透体壁并在虫体内生长, 并且 36 h 后就能观察到表皮下面产生芽生孢子, 说明白僵菌 GZGY-1-3 菌株已经成功地抵御了烟粉虱的免疫反应, 开始在虫体内复制。72 h 后, 白僵菌 GZGY-1-3 菌株已经能在虫体外生成了具有侵染能力的繁殖体-分生孢子。这说明了 GZGY-1-3 菌株在烟粉虱综合治理中的应用潜力。

参考文献 (References)

- Brown JK, Frohlich DR, Rosell RC, 1995. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? *Ann. Rev. Ent.*, 40: 511–534.
- Faria M, Wraight SP, 2001. Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. *Crop Protection*, 20 (9): 767–778.
- James RR, Buckner JS, Freeman TP, 2003. Cuticular lipids and silverleaf whitefly stage affect conidial germination of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 84(2): 67–74.
- Jones KH, Sneft JA. 1985. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *Journal of Histochemistry Cytochemistry*. 33(1): 77–79.
- Liu TX, Stansly PA, 2009. Effects of relative humidity on efficacy of BotaniGuard™ (*Beauveria bassiana*) on nymphs of sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) on hibiscus in greenhouses. *Southwest Entomologist*, 34(2): 189–191.
- Liu Z, Lei Z, Hua B, Wang Y, Wen J, Huang H, 2006. Histopathological changes of *Bemisia tabaci* infected by *Beauveria bassiana*. *Plant Protection*, 32(3): 52–54. [刘召, 雷仲仁, 花保祯, 王音, 问锦曾, 黄虹, 2006. 烟粉虱感染白僵菌后的组织病理变化. 植物保护, 32(3): 52–54.]
- Liu Z, Lei Z, Hua B, Wang H, Liu T, 2010. Germination behavior of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) nymphs. *Journal of Entomology Science*, 45(4): 322–334.
- Luo C, Zhang J, Shi B, Zhang F, Zhang Z, 2000. Preliminary investigation of host-plant of *Bemisia tabaci* (Gennadius) in Beijing. *Beijing Agricultural Sciences*, (plus): 42–47. [罗晨, 张君明, 石宝才, 张帆, 张芝利, 2000. 北京地区烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius)调查初报. 北京农业科学,(增刊): 42–47.]
- Schading RL, Carruthers RI, Mullin-Schading BA, 1995. Rapid determination of conidial viability for entomopathogenic hyphomycetes using fluorescence microscopy technology. *Biocontrol Science and Technology*, 5(2): 201–208.
- Wang Z, Yan H, Yang Y, Wu Y, 2010. Biotype and insecticide resistance status of the whitefly *Bemisia tabaci* from China. *Pest Management Science*, 66 (12): 1360–1366.
- Wang Y, Lei ZR, Zhang QW, Wen JZ, 2005. Microscopic observations of infection process of *Metarhizium anisopliae* on the cuticle of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Acta Entomologica Sinica*, 48(2): 188–193. [王音, 雷仲仁, 张青文, 问锦曾, 2005. 绿僵菌侵染小菜蛾体表过程的显微观察. 昆虫学报, 48(2): 188–193.]
- Wang Y, Lei ZR, Zhang QW, Wen JZ, 2006. Observation of infection process of *Metarhizium anisopliae* on *Plutella xylostella* larvae with transmission electron microscopy. *Acta Entomologica Sinica*, 49(6):1042–1045. [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.]
- Wraight SP, Carruthers RI, Bradley CA, Jaronski ST, Lacey LA, Wood P, Galaini-Wraight S, 1998. Pathogenitity of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces* spp. and *Beauveria bassiana* against the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 71(3): 217–226.
- Wraight SP, Carruthers RI, Jaronski ST, Bradley CA, Garza CJ, Galaini-Wraight S, 2000. Evaluation of the entomopathogenic

- fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Biological Control*, 17(3): 203–217.
- Vey A, Hoagland R, Butt TM, 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents// Butt TM, Jackson CW, Magan N (eds.). *Fungi as Biocontrol Agents Progress, Problems and Potential*. Wallingford: CABI Publishing. 311–346.
- Zhang Y, Lei ZR, Wang HH, Ji QZ, 2013. Prokaryocyte expression and immune localization of HsbA in *Beauveria bassiana*. *Scientia Agricultura Sinica*, 46(21): 4534–4541. [张烨, 雷仲仁, 王海鸿, 吉青战, 2013. 球孢白僵菌 HsbA 蛋白的原核表达及免疫定位. *中国农业科学*, 46(21): 4534–4541.]
- Zhou R, 1949. China's list of whitefly. *Entomologia Sinica*, 3(4):1–18. [周尧, 1949. 中国粉虱名录. *中国昆虫*, 3(4):1–18.]