

球孢白僵菌在棉铃虫表皮上萌发的研究*

翟锦彬** 黄秀梨

(北京师范大学生物系 北京 100875)

摘要 在扫描电子显微镜下,观察了球孢白僵菌三株不同毒力菌株的分生孢子在棉铃虫幼虫表皮表面的萌发,发现高、低毒力菌株的分生孢子都能在棉铃虫幼虫表皮上萌发和生长,但高毒力菌株的萌芽管伸长至分生孢子长径的1.5~2.5倍时能发生定向生长,垂直向里穿透表皮,低毒力菌株的萌芽管呈蔓延生长,极少有穿透表皮的发生,偶见极度伸长的菌丝穿透表皮。此外,还发现球孢白僵菌穿透菌丝穿透表皮的过程不是垂直向里一步完成的。

关键词 球孢白僵菌,棉铃虫,分生孢子,萌发

提高农作物产量和质量是当代农业的中心任务。农业的极大潜力之一就是保护农作物免于有害生物的危害,目前广泛采用化学方法和生物防治方法相结合的策略保护农作物。球孢白僵菌符合主要生物制剂对微生物提出的一些基本要求,即对温血动物和植物无害、容易培养、致病性足以使害虫数量减少至许可水平之下等^[1],因此它在生物防治中占有特殊地位。利用球孢白僵菌防治的有棉铃虫、玉米螟、大豆食心虫、马铃薯甲虫、桃小食心虫等大田和果树害虫,以及松毛虫等森林害虫。生产应用的发展要求理论上的总结和提高,对昆虫病原性真菌(包括球孢白僵菌)的研究还很不够,例如,它们与寄生昆虫的相互关系问题、生理学和生态学问题、变异问题等,暂时限制了它们在实践中的一步应用。作者以三株不同毒力的球孢白僵菌为材料,观察并比较了它们的分生孢子

1 材料和方法

1.1 试验菌株和昆虫

1.1.1 球孢白僵菌: 9183 菌株和 1003 菌株是本实验室保存的菌株,1003-V 菌株是 1003 菌株在棉铃虫上重新复壮分离得到的。

1.1.2 棉铃虫: 从北京农业大学植保系昆虫室购得棉铃虫卵,本实验室孵化和饲养。刚完成蜕皮的五龄幼虫置 10℃ 冰箱保存备用,直至收集到足够实验用幼虫。实验选用个体大小一致、生长发育同步的五龄幼虫。

1.2 培养基和培养方法

1.2.1 PDA 培养基(调 pH=6.0)。

* 国家自然科学基金资助项目。

** 现为中国医学科学院基础医学研究所博士生
本文于 1995 年 11 月 14 日收到。

1.2.2 球孢白僵菌的培养: 用划线法把球孢白僵菌接种于PDA斜面培养基上, 27℃, 12d, 可见菌体表面有一层淡黄色的分生孢子, 4℃保存备用。

1.3 棉铃虫的感染^[2]

从斜面收集分生孢子, 用无菌生理盐水配制成孢子悬液, 浓度为 1×10^8 分生孢子/ml, 实验用的五龄幼虫经4℃麻痹1h后, 头朝上把胸部以下部分浸于分生孢子悬液中, 3s后取出。

1.4 球孢白僵菌毒力的测定

用9183、1003和1003-V菌株, 分别以等浓度分生孢子悬液感染棉铃虫, 40只/组, 每只单独饲养; 以无菌生理盐水代替分生孢子悬液作对照; 每隔24h称体重, 并记录死亡的幼虫数, 直至全部棉铃虫死亡或化蛹为止。

1.5 扫描电子显微镜生物样品的制备

棉铃虫感染球孢白僵菌后分别饲养6、12、18、24、36、48、60h, 断头处死幼虫, 用锋利刀片切取一块体壁, 剔除皮下组织, 切成 5×5 mm大小的样品块, 2.5%戊二醛前固定1h, 1%锇酸后固定2h, 丙酮系列脱水, 然后于1:1(丙酮: 醋酸异戊酯)中过渡30min, 置于纯醋酸异戊酯中待临界点干燥, 喷金, 在S-510扫描电子显微镜下观察。

1.6 透射电子显微镜生物样品的制备

棉铃虫感染球孢白僵菌1003-V菌株后, 分别饲养6、12、18、24、36、48和60h后, 断头处死, 用锋利刀片切取一块体壁, 切成边长小于0.5mm的小块, 在4℃下用2.5%戊二醛前固定2h, 1%锇酸后固定2h, 丙酮系列脱水后, 在1:1的丙酮与Epon 812包埋剂中浸透2h, 再在纯包埋剂中浸透30min, 最后将样品放入包埋模块中, 30℃浸透24h, 60℃聚合48h。包埋块经修整后用LKB-III型超薄切片机超薄切片(约700Å), 经铀-铅双染, 在日立H-600透射电子显微镜下观察。

2 结果

2.1 菌株的毒力比较

本实验所用的三株菌株毒力各不相同(图1), 感染后第8天, 9183、1003和1003-V菌株的棉铃虫死亡率分别为57.5%、100%和100%。半致死时间(LT_{50})分别为9183菌株7.78d, 1003菌株6.14d, 1003-V菌株5.44d。1003-V菌株使受感染的棉铃虫大量死亡(>80%死亡率)的时间比1003菌株短1d。

观察还发现在球孢白僵菌致病过程中, 受侵染棉铃虫摄食量减少, 体重增加减慢(图2), 个体生长发育受到影响, 死亡前体重有下降趋势。

2.2 分生孢子萌发的扫描电子显微镜观察

观察发现9183、1003和1003-V菌株的分生孢子在棉铃虫幼虫表皮表面都能萌发。以1003-V菌株为例, 分生孢子附着后6h, 分生孢子稍呈椭圆形, 并产生尖状突起(图版I-1)。附着后12h, 分生孢子已经萌发, 形成的萌芽管紧贴于表皮生长; 第24h, 萌芽管继续在表皮上伸长生长, 此时常可见萌芽管下面的表皮呈凹陷状, 可能是萌芽管分泌的水解酶所致(图版I-2)。在附着后第36h和第48h, 萌芽管发生定向生长、垂直向里穿透表皮(图版I-3)。在穿透表皮前, 1003-V菌株部分萌芽管顶端细胞分化形成附

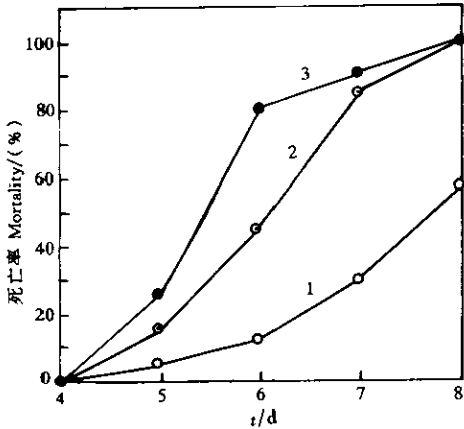


图1 感染不同毒力球孢白僵菌菌株后棉铃虫死亡率变化

Fig. 1 Changes of mortality of *Heliothis zea* after infecting different virulent strains of *Beauveria bassiana*

1. 9183; 2. 1003; 3. 1003-V.

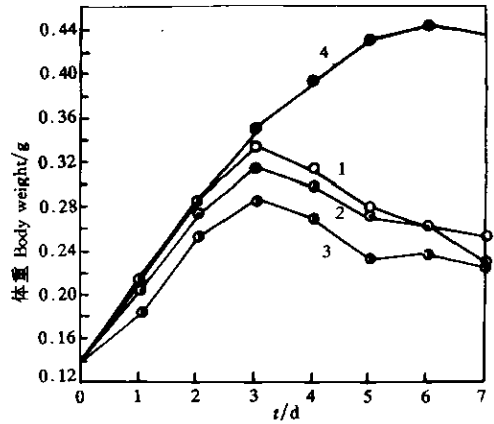


图2 球孢白僵菌感染后棉铃虫体重的变化

Fig. 2 Changes of weight of *Heliothis zea* after

infecting *Beauveria bassiana*

1. 9183; 2. 1003; 3. 1003-V.

着胞样结构(图版 I-4)。1003 菌株分生孢子的萌发、萌芽管的生长行为与 1003-V 菌株相似,只是 1003 菌株的萌芽管在穿透表皮之前常伸长得较长(图版 I-5)。在扫描电子显微镜下对 1003-V 和 1003 菌株萌发前分生孢子的大小和穿透表皮时萌芽管伸长的长度进行了测量,1003-V 菌株分生孢子大小和萌芽管长度分别为 $(1.695 \pm 0.074) \mu\text{m} \times (2.48 \pm 0.239) \mu\text{m}$ 和 $3.778 \pm 0.696 \mu\text{m}$, 1003 菌株为 $(1.69 \pm 0.069) \mu\text{m} \times (2.16 \pm 0.15) \mu\text{m}$ 和 $6.781 \pm 0.642 \mu\text{m}$, 可见两个菌株的分生孢子大小无显著差异,但在穿透发生时,1003 菌株萌芽管常伸长至孢子长径的 2.5 倍。9183 菌株的分生孢子萌发后,萌芽管常表现为极度伸长,蔓延生长(图版 I-6)。

2.3 球孢白僵菌孢子萌发的透射电镜观察

昆虫躯体的表面有一层非细胞性的表皮结构(图版 I-7),球孢白僵菌侵染棉铃虫需要突破表皮屏障(图版 I-8,9)。在非细胞性表皮结构中,球孢白僵菌的穿透菌丝仍然保持有细胞壁结构,且细胞壁电子致密度高,十分明显;菌丝周围的表皮呈空泡状,与正常表皮相比,它结构疏松,排列不整齐(图版 I-8,9 中箭头处);穿透菌丝下面的表皮内侧常有电子致密度高的黑色颗粒聚集;球孢白僵菌穿透菌丝对棉铃虫表皮的穿透不是垂直向里一步完成的。

3 讨论

本实验所用三株球孢白僵菌的毒力各不相同,9183 菌株的毒力最弱,1003 和 1003-V 菌株是高毒力菌株。在扫描电子显微镜下观察到三菌株的分生孢子都能附着在棉铃虫幼虫表皮。Boucias 等人认为球孢白僵菌等昆虫病原性真菌的分生孢子对昆虫表皮的附着是被动和非特异性的,既能附着在寄主表皮上,也能附着在非寄主表皮上,认为附着作

用实质上是由分生孢子壁和表皮间疏水作用力介导的^[1]。本实验的观察结果表明, 分生孢子对表皮的附着与菌株的毒力没有必然的联系。

病原性真菌对寄主表皮的穿透, 需要在穿透前的分生孢子萌发。分生孢子的萌发一方面要求有充足的营养, 另一方面要求环境中的抑制性因素在许可水平之下。球孢白僵菌分生孢子本身贮存有可供萌发使用的氮源物质, 因此萌发时它对营养的要求并不复杂, 环境中可利用的碳源物质即可^[4]。经分析棉铃虫幼虫表皮有足够支持分生孢子萌发和菌丝有限生长的氨基酸和葡萄糖胺的存在^[5]。同时棉铃虫幼虫表皮含有自由脂肪酸, 主要是辛酸。辛酸有抑制球孢白僵菌分生孢子萌发的能力^[6]。本实验观察到高毒力菌株(1003和1003-V)和低毒力菌株(9183)的分生孢子都能在棉铃虫表皮上萌发, 表明在利用棉铃虫幼虫表皮上的营养物质和克服表皮上抑制性物质(如辛酸)的抑制作用的能力方面与菌株的毒力没有直接关系。

球孢白僵菌与寄主间寄生关系的建立, 是通过球孢白僵菌侵入寄主体内繁殖而完成的。球孢白僵菌侵入昆虫体内有三种途径: 消化道、呼吸系统和表皮。经表皮侵入的途径最主要和常见。棉铃虫表皮没有萌芽管可以直接穿过的自然孔道^[7]。萌芽管必须穿透表皮才能得以进入寄主体内繁殖, 对表皮的穿透是感染成立的一个重要前提。本实验观察到高毒力菌株(1003和1003-V)的分生孢子萌发后不久, 萌芽管就能向里穿透表皮; 而低毒力菌株(9183)的萌芽管在表皮表面已经极度伸长, 极少观察到穿透表皮的发生。说明萌芽管能否高效地穿透表皮是高毒力菌株和低毒力菌株的一个重要区别。

本实验还观察到, 同样是高毒力菌株, 1003-V菌株在穿透表皮时, 萌芽管伸长的长度小于1003菌株, 而且在穿透发生前, 1003-V菌株有一部分萌芽管顶端细胞常膨大, 成为附着胞样的结构。Alian Vey等观察到球孢白僵菌在马铃薯甲虫幼虫表皮上形成附着胞样结构^[8], Sue Pekrul在研究棉铃虫幼虫表皮时, 认为球孢白僵菌没有附着胞样结构的产生^[9]。我们的结果表明球孢白僵菌穿透棉铃虫幼虫表皮时, 可以形成或不形成附着胞样结构, 附着胞样结构可能有利于穿透的发生。

表皮是覆盖昆虫躯体的一种异质非细胞层, 它是昆虫防御水分、病原体以及杀虫剂等侵袭的屏障, 对昆虫起着重要的保护作用。昆虫病原性真菌侵染寄主昆虫必须突破表皮的屏障。对金龟子绿僵菌的研究表明, 表皮的穿透是酶的降解和菌丝生长的机械压力联合作用的结果^[10]。本实验观察到在穿透过程中, 球孢白僵菌仍保持有完整的细胞壁, 穿透菌丝周围的表皮结构疏松, 呈空泡状, 可能是穿透菌丝分泌的胞外表皮降解酶降解所致。观察还发现在穿透菌丝下面的表皮内侧常有电子致密度高的颗粒聚集, 可能是棉铃虫对球孢白僵菌菌丝穿透的一种表皮防御反应, 因为真菌细胞壁的 β -1,3-葡聚糖和表皮的物理损伤都能诱导昆虫表皮的黑化^[11~13]。

参 考 文 献

- [1] Dunn P H, Mechalas B J. *J Invertebr Pathol*, 1963, 5(4): 451 ~ 455.
- [2] Michael J B, George G K. *J Invertebr Pathol*, 1991, 58: 106 ~ 110.
- [3] Boucias D G, Pendland J C, Latge J P. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54: 1795 ~ 1805.
- [4] Smith R J, Grula E A. *J Invertebr Pathol*, 1981, 37: 222 ~ 230.
- [5] Woods S P, Grula E A. *J Invertebr Pathol*, 1984, 43: 259 ~ 269.

- [6] Smith R J, Grula E A. *J Invertebr Pathol*, 1982, **39**: 15 ~ 22.
 [7] Smith R J, Pekrul S, Grula E A. *J Invertebr Pathol*, 1981, **38**: 335 ~ 344.
 [8] Vey A, Fargues J. *J Invertebr Pathol*, 1977, **30**: 207 ~ 215.
 [9] Pekrul S, Grula E A. *J Invertebr Pathol*, 1979, **34**: 238 ~ 247.
 [10] Geotell M S, Stieger R J, Rizzo N W et al. *J Gen Microbiol*, 1989, **135**: 2233 ~ 2239.
 [11] Butt T M, Wraight S P, Galaimi-Wraight S. *J Invertebr Pathol*, 1988, **52**: 49 ~ 59.
 [12] Murrin F, Nolan R A. *Can J Bot*, 1987, **65**: 1694 ~ 1706.
 [13] Soderhall K. *Dev Comp Immunol*, 1982, **5**: 565 ~ 572.

STUDIES ON BEHAVIOUR OF GERMINATION OF CONIDIA FROM *BEAVERIA BASSIANA* ON THE CUTICLE OF *HELIOTHIS ZEA*

Zhai Jinbin Huang Xiuli

(Department of Biology, Beijing Normal University, Beijing 100875)

Abstract This paper studied on germination process of the conidia of three different virulent strains of *Beauveria bassiana* with scanning electron microscope (SEM) and transmission electron microscope (TEM). We discovered both high and low virulent strains in the cuticle of *Heliothis zea* can germinate. The germ tubes of high virulent strains were directional growth and penetrated the cuticle, when it stretched to 1.5 to 2.5 times of conidia length. The germ tubes of low virulent strains grew extensively and less penetrated cuticle. The process of hypha penetrant cuticle could not be successive by one step.

Key words *Beauveria bassiana*, *Heliothis zea*, Conidia, Germinal behaviour

图 版 说 明

Explanation of plate

1 ~ 4. 1003-V 菌株分生孢子在棉铃虫表皮表面的萌发, CO. 分生孢子; GT. 萌芽管; AP. 附着胞(1, 3. 10000×; 2. 8000×; 4. 5000×); 5. 1003 菌株分生孢子(CO)及萌芽管(GT)(15000×); 6. 9183 菌株分生孢子萌发(1500×); 7. 棉铃虫的体壁结构及其表皮(CU)(箭头处, 4000×); 8, 9. 穿过程中棉铃虫表皮(CU)和球孢白僵菌的穿透菌丝(PH)(35000×).

1 ~ 4. Behaviour of germination of conidia from 1003-V strain in cuticle surface of *Heliothis zea*, CO. Conidia; GT. Germ tube; AP. Appressorium; 5. Conidia (CO) and germ tubes (GT) of 1003 strain; 6. Behaviour of germination of conidia from 9183 strain; 7. The structure of body wall and cuticle (CU); 8, 9. Cuticle (CU) of *Heliothis zea* and penetrant hyphae (PH) of *Beauveria bassiana* during penetration.