



张志建, 郑长英, 赵川德, 等. 利用冷冻切片对球孢白僵菌侵染西花蓟马过程的观察 [J]. 环境昆虫学报, 2017, 39 (1): 181–186.

利用冷冻切片对球孢白僵菌侵染 西花蓟马过程的观察

张志建¹, 郑长英¹, 赵川德¹, 万方浩^{1,2}, 王俊平^{1*}

(1. 青岛农业大学农学与植物保护学院, 山东省植物病虫害综合防控重点实验室, 山东青岛 266109;

2. 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 100193)

摘要: 为探索球孢白僵菌对西花蓟马的侵染, 研究球孢白僵菌在西花蓟马体表和虫体内的侵染过程, 采用冷冻切片与 HE 染色技术, 对被球孢白僵菌侵染的西花蓟马成虫进行组织切片及 HE 染色。结果表明, 接菌 4 h, 体表粘附的孢子开始萌发, 8–12 h 芽管继续伸长并出现穿透体壁。18 h 虫菌体出现在西花蓟马体内, 球孢白僵菌成功侵入西花蓟马体内。之后, 西花蓟马体内虫菌体、菌丝明显增多, 各组织器官均受到感染, 消化道、肌肉组织等发生病变。

关键词: 西花蓟马; 球孢白僵菌; 冷冻切片; 侵染; 组织病理变化

中图分类号: Q965; S476

文献标识码: A

文章编号: 1674–0858 (2017) 01–0181–06

Microscopic observations of the process of *Beauveria bassiana* infecting *Frankliniella occidentalis* through frozen sections

ZHANG Zhi-Jian¹, ZHENG Chang-Ying¹, ZHAO Chuan-De¹, WAN Fang-Hao^{1,2}, WANG Jun-Ping^{1*}

(1. Key Laboratory of Integrated Crop Pest Management of Shandong Province, College of Agronomy and Plant Protection, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong Province, China; 2. Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: The pathological changes of *Frankliniella occidentalis* infected by *Beauveria bassiana* were observed using frozen sections with hematoxylin-eosin (H & E) staining. The result showed that the conidia began to germinate which adhesion on the cuticle after inoculated 4 h. Within 8–12 h after inoculation, the germ tubes continued to elongation and appeared penetrating the integument. At 18 h post inoculation, the hyphal bodies succeeded to be observe in the internal tissue and began to reproduce in the hemocoel. And then, the hyphal bodies and hyphae increased, tissues and organs were infected, muscle tissue and alimentary canal began to undergo pathological changes.

Key words: *Frankliniella occidentalis*; *Beauveria bassiana*; frozen sections; infect; histopathological changes

基金项目: 国家自然科学基金 (31201777); 青岛农业大学高层次人才科研基金 (630609); 山东省“泰山学者”建设工程专项经费; 青岛农业大学应用型人才培养特色名校建设工程大学生科技创新项目

作者简介: 张志建, 女, 1990 年生, 山东潍坊人, 硕士研究生, 主要从事农业昆虫与害虫防治研究

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: junpingwang@qau.edu.cn

收稿日期 Received: 2015–12–31; 接受日期 Accepted: 2016–03–15

西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* (Pergande) 2003 年在我国北京首次发现 (张友军, 2003)。西花蓟马食性杂, 在 500 多种植物上都有发现, 对多种作物的产量和品质造成了巨大的危害, 目前已成为我国露地和温室蔬菜生产的重要害虫 (戴霖, 2004; 任洁, 2006; 吕要斌 2011)。

目前, 对西花蓟马的防治主要依靠化学防治并发现已经对很多杀虫剂产生抗药性 (Kirk, 2003; 张帆, 2015)。因此, 探索其生物防治, 寻求和完善对其的综合防治策略, 是解决西花蓟马问题的有效途径。

球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin 是害虫微生物防治的重要资源, 在我国主要用来防治松毛虫、玉米螟、水稻叶蝉、温室白粉虱以及月季长管蚜等多种害虫。此外, 球孢白僵菌主要通过寄主体壁接触感染而致死各类害虫, 极其适合于锉吸式口器的西花蓟马的微生物防治 (Feng, 1994)。

目前, 白僵菌对甜菜夜蛾 *Laphygma exigua* Hübner、桃小食心虫 *Carposina sasakii*、油松毛虫 *Dendrolimus tabulaeformis*、桑天牛 *Apriona germari*、烟粉虱 *Bemisia tabaci* 等多种昆虫的组织病理学已进行研究 (刘召, 2006; 宋入梅, 2006; 王晓红, 2009; 张艳梅, 2011)。球孢白僵菌对西花蓟马的研究则注重于高毒力菌株的筛选 (李银平, 2013; 袁盛勇, 2013; Xiong, 2013), 而球孢白僵菌对西花蓟马的侵染过程未进行系统的研究, 只有金龟子绿僵菌对西花蓟马侵染过程的研究 (Vestergaard, 1999)。本研究旨在利用冷冻切片技术, 研究球孢白僵菌对西花蓟马体壁和体内组织侵染过程, 为利用球孢白僵菌防治西花蓟马提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株和昆虫

球孢白僵菌 BbYT 11 菌株, 保存于青岛农业大学昆虫生态学实验室。西花蓟马雌成虫, 采用新鲜芸豆进行饲养, 培养条件为自然光照, 温度为 $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

1.2 孢子悬浮液的配制

球孢白僵菌在 SDAY 培养基上于 25°C , 10 L:14 D 的光照条件下培养 7 d, 无菌棒刮取分生孢子粉于 1.5 mL Eppendorf 管中, 加入适量含

0.1% 吐温-80 无菌水和 3 个直径为 8 mm 的玻璃球, 然后强力振荡将分生孢子充分混匀, 配成 1.0×10^8 个/mL 孢子悬液, 4°C 保存, 备用。

1.3 球孢白僵菌接种西花蓟马

采用喷雾法接菌。用自制取虫器从养虫瓶中取西花蓟马成虫, 置于底部铺有滤纸的养虫盒中, 将 1.0 mL 1.0×10^8 个/mL 球孢白僵菌 BbYT 11 孢悬液用 Aldrich chromatography sprayer 向西花蓟马喷雾, 保鲜膜覆盖封口, 放于 $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、RH 90%、L:D=16:8 条件下饲养, 每隔 3 d 更换新鲜芸豆。

1.4 冷冻切片的制备

(1) 防脱玻片制备: 将载玻片经洗涤剂浸泡 24–48 h, 流水冲洗烤干; 后浸于重铬酸钾洗液中过夜, 蒸馏水冲洗, 烤干后浸泡 95% 的酒精中过夜, 蒸馏水洗 3 次, 烤干。然后将载玻片浸泡明胶硫酸铬钾溶液中 3 次, 每次 2 min, 取出载玻片控尽液体后置入 $60^{\circ}\text{C} - 70^{\circ}\text{C}$ 烤箱中烘干 1 h 备用。

(2) 西花蓟马接菌后分别于 1 h、4 h、8 h、12 h、18 h、24 h、36 h、48 h、56 h、72 h 进行取样, 将样品经 10% 中性甲醛 4°C 固定 24 h, 后经蔗糖梯度溶液 4°C 脱水过夜。常规包埋, 采用自动冷冻切片机 (Thermo Microm HM 525) 连续切片, 厚度 10 μm , 采用 HE 方法进行染色参照张艳梅 (2011) 方法并进行改进, 后进行显微观察, 拍照。

2 结果与分析

2.1 球孢白僵菌在西花蓟马成虫体表的入侵

接菌后球孢白僵菌分生孢子首先粘附在西花蓟马的体表, 4 h 后附着于体壁的分生孢子开始萌发, 部分分生孢子长出短的芽管 (图 1A)。接菌 8 h, 萌发的分生孢子增多, 已经萌发的分生孢子芽管伸长, 部分开始定向体壁生长, 开始穿透体壁 (图 1B)。接菌 12 h, 穿透体壁的分生孢子增多, 芽管继续在体壁中伸长 (图 1C)。接菌 18 h, 大量的分生孢子穿透西花蓟马的体壁。同时, 西花蓟马体内出现短棒状的虫菌体 (图 1D), 表明球孢白僵菌已成功侵入西花蓟马体内。

2.2 球孢白僵菌对西花蓟马成虫体内侵染

球孢白僵菌的虫菌体在接菌 18 h 开始出现在西花蓟马体内, 24 h 后西花蓟马体腔内的虫菌体增多 (图 2A)。接菌 36 h 后, 西花蓟马成虫出现

死亡现象,死亡虫体的体腔内有大量的虫菌体(图2B);同时,活虫体内的各个组织之间出现虫菌体(图2C)。接菌48 h后,虫体内虫菌体不断增加,各组织器官均受到感染出现虫菌体。同时,死亡虫体内出现菌丝(图2D)。接菌56 h后,消化道、肌肉组织等组织发生病变(图2E-F),边缘模糊不清,存在大量虫菌体,并活虫体内出现

少量菌丝(图2G),而死亡西花蓟马的体内出现大量的菌丝(图2H)。接菌64 h,西花蓟马活虫体内充满虫菌体,菌丝增多(图3B);死虫体内组织解离(图3A)。接菌72 h,菌丝成功突破表皮向外生长,在西花蓟马体壁外产生分生孢子(图3C-D)。

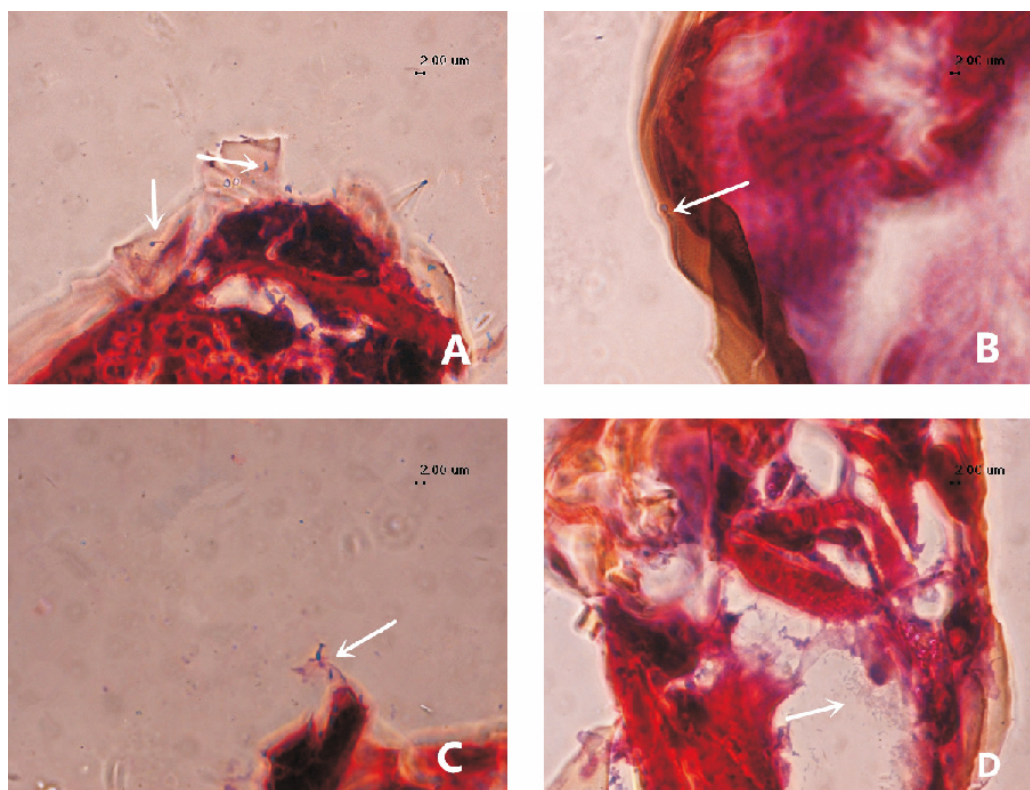


图1 球孢白僵菌 YT 11 菌株在西花蓟马体表的侵染

Fig. 1 Frozen sections of *Frankliniella occidentalis* infected with *Beauveria bassiana* YT 11 strain on the integument

注: A, 球孢白僵菌 A 菌株接菌 4 h 后,分生孢子萌发; B, 接菌 8 h,向体壁生长的芽管; C, 接菌 12 h,孢子芽管穿透体壁,在体壁中伸长; D, 接菌 18 h,西花蓟马体内开始出现虫菌体。Note: A, within 4 h after inoculation, the conidia germinated and produced germ tubes; B, after 8 h post treatment, germ tubes grew to cuticle; C, at 12 h post-inoculation, the germinated conidia were penetrating the integument; D, after 18 h treated, the hyphal bodies were observed in the insects.

3 结论与讨论

冰冻切片是利用低温把组织迅速冷冻到达一定的硬度,利用恒温切片机进行切片的一种方法,常用于组织化学、免疫定位及原位杂交等研究(李建霞,2013)。本试验过程中采用石蜡切片的方法,切片制作及染色过程繁琐,耗时长;因而采用冷冻切片方法,发现较石蜡切片方法过程简洁快速,缩短试验时间,提高效率。在组织切片染色过程中,样品脱片问题是影响试验的重要技

术环节(杨秀静,2014)。为解决样品脱片问题,本试验在以下方面进行改进:(1)载玻片均采用明胶硫酸铬钾处理,制作防脱玻片:参照于德钦(2009)方法并改进,由于组织大小不同,调整浸泡明胶硫酸铬钾溶液的时间为2 min/次,防脱效果较好。(2)在制成冷冻切片后,应先将切片室温晾置约2 h,避免立即进行染色,否则在染色过程中会造成样品大量脱片,但最好在7 h之内染色,否则会造成样品在染色过程中上色困难。(3)HE染色过程中,将切片置于酒精灯上烤3-5 s,后95%乙醇固定5 min。采用上述方法后对防止冷

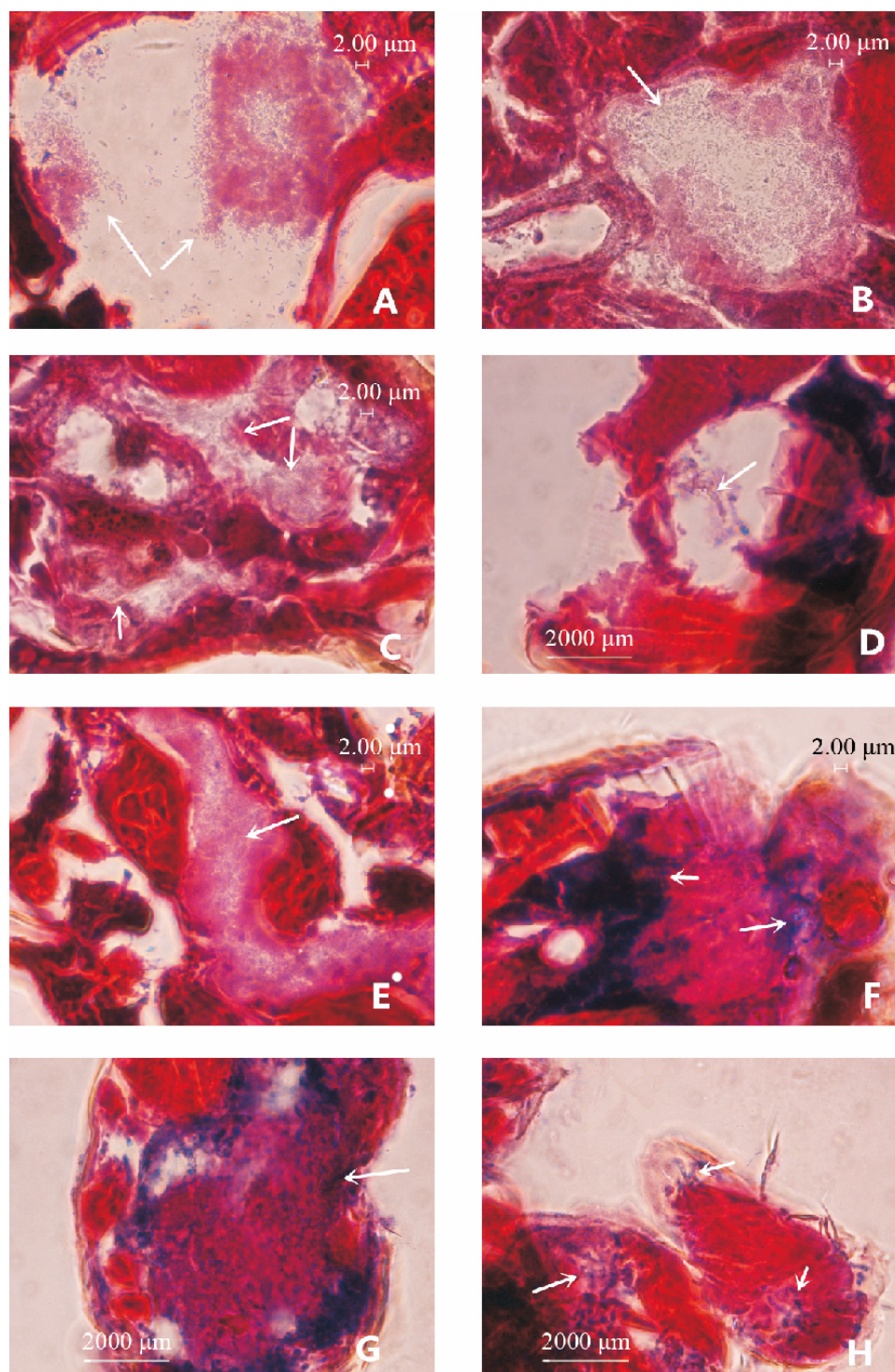


图2 西花蓟马感染球孢白僵菌 YT 11 菌株后体内组织变化

Fig. 2 The pathological changes of *Frankliniella occidentalis* infected by *Beauveria bassiana* YT 11

注: A, 接菌 24 h, 西花蓟马体内增多的虫菌体; B, 侵染 36 h, 死亡西花蓟马体内的虫菌体; C, 接菌 48 h, 活虫体内组织间的虫菌体; D, 接菌 48 h, 死亡虫体内开始出现的菌丝; E, 接菌 56 h, 被侵染的消化道中的虫菌体; F, 接菌 56 h, 被侵染肌肉组织中的菌丝; G - H, 接菌 56 h, 活虫与死亡虫体内的菌丝。Note: A, after 24 h post treatment, the hyphal bodies increased; B, the hyphal bodies in the dead insect at 36 h post inoculation; C, the hyphal bodies were among the tissues in the live insect; D, after 48 h treated, the hyphae occurred in the dead *F. occidentalis*; E, after 56 h inoculation, the hyphal bodies shown in the alimentary canal; F, at 56 h post - inoculation, the hyphae invaded the muscle tissue; G - H, the hyphae were observed in live and dead insects.

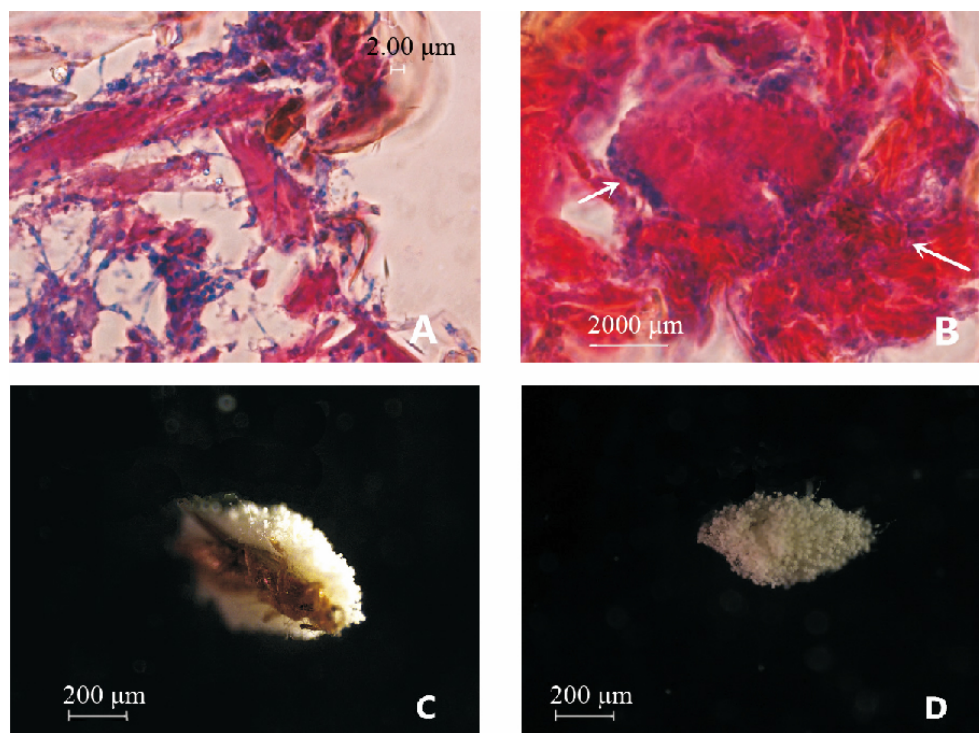


图3 西花蓟马感染球孢白僵菌 YT 11 菌株后期体内与体表变化

Fig. 3 The post changes of *Frankliniella occidentalis* infected by *Beauveria bassiana* YT 11

注: A, 接菌 64 h, 组织解离的死亡西花蓟马; B, 接菌 64 h, 充满虫体与菌丝的西花蓟马活虫; C、D, 接菌 72 h, 菌丝突破体壁, 覆盖虫尸并成功在体表产孢。Note: A, the tissues were disintegrated in the dead insect; B, the live hosts were full with hyphae and hyphal bodies; C、D, the hyphae broke the integument, covered insect and successfully produced the conidia on the surface.

冻切片脱片问题非常有效, 从而能更好的用于组织病理学变化的观察。

分生孢子的粘附与萌发是昆虫病原真菌入侵的第一步, 也是成功入侵的基础。绿僵菌侵染虫体时分生孢子萌发行为和致病性受寄主表皮组成物质如碳水化合物、脂肪酸等物质的影响 (Butt, 1995; Drauzio, 2004), 虫体体表结构也对白僵菌的入侵行为有重要影响, 王晓红等 (2009) 发现球孢白僵菌侵入桑天牛 *Apriona germari* 幼虫表皮时, 有一定的选择性: 在不适宜的体表处, 孢子具有先平行生长, 待遇到合适的侵入点再开始入侵, 而本试验中未发现球孢白僵菌对西花蓟马体壁不同结构区域入侵时具有选择性。有研究发现球孢白僵菌接种菲岛玉米蜡蝉 *Peregrinus maidis* 后 72 h 分生孢子大量萌发; 而球孢白僵菌侵染烟粉虱, 接菌 10 h 后孢子开始萌发 (Toledo, 2010)。从而表明球孢白僵菌在不同寄主的体壁的萌发速度存在明显差异, 而本研究在试验中发现菌株 BbYT11 在接种西花蓟马 4 h 后分生孢子已开始萌发, 有研究发现烟粉虱 *Bemisia tabaci* 表皮内脂类

物质对白僵菌的萌发有一定的抑制作用 (刘召, 2006), 而赵成银 (2001) 等分析研究西花蓟马体壁, 未发现对球孢白僵菌分生孢子萌发的抑制脂类物质。

通过金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 对西花蓟马侵染过程的研究, 表明接种后 12 h 产生附着胞, 3 d 后才在虫体血腔中定殖 (Vestergaard, 1999)。Wu 等 (2014) 研究表明球孢白僵菌接种西花蓟马 24 h 后, 分生孢子萌发, 芽管定向体壁生长, 36 h 才开始侵入体壁。BbYT 11 菌株处理西花蓟马 4 h 后, 部分分生孢子萌发并长出芽管, 部分芽管开始定向穿透体壁出现在侵染 8 h。至接菌 18 h, 大量的分生孢子萌发穿透体壁, 虫体内开始出现虫体。产生这种差异的原因可能是不同菌株间毒力存在较大差异。

参考文献 (References)

- Butt TM, Ibrathin L, Clark SJ, et al. The germination behavior of *Metarhizium anisopliae* on the surface of aphid and flea beetle cuticles [J]. *Myclo. Res.*, 1995, 99 (8): 945-950.
- Dai L, Du YZ, Zhang LW. A preliminary study on the suitable

- establishment areas of the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) in China [J]. *Plant Protection*, 2004, 30 (6): 48–51. [戴霖, 杜予州, 张刘伟, 等. 西花蓟马在中国适生性分布研究初报 [J]. 植物保护, 2004, 30 (6): 48–51]
- Feng MG, Poprawski TJ, Khachatourians GG. Production formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: Current status [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, 4 (1): 33–34.
- Kirk WDJ, Terry LL. The spread of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande) [J]. *Agr. Forest Entomol.*, 2003, 5: 301–310.
- Li JX, Zhang CL, Xia XF, et al. Cryo-sectioning conditions and histochemistry comparison with paraffin sectioning [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2013, 48 (6): 643–650. [李建霞, 张出兰, 夏晓飞, 等. 植物冰冻切片条件的优化及其与石蜡切片在组织化学应用中的比较 [J]. 植物学报, 2013, 48 (6): 643–650]
- Li YP, Lei ZR, Wang HH. Selection of *Beauveria bassiana* strains against *Frankliniella occidentalis* and their conidial production characteristics [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2013, 29 (2): 219–226. [李银平, 雷仲仁, 王海鸿. 对西花蓟马高效的球孢白僵菌菌株筛选及产孢特性研究 [J]. 中国生物防治学报, 2013, 29 (2): 219–226]
- Lv YB, Zhang ZJ, Wu QJ, et al. Research progress of the monitoring, forecast and sustainable management of invasive alien pest *Frankliniella occidentalis* in China [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2011, 48 (3): 488–496. [吕要斌, 张治军, 吴青君, 等. 外来入侵害虫西花蓟马防控技术研究与示范 [J]. 应用昆虫学报, 2011, 48 (3): 488–496]
- Liu Z, Lei ZR, Hua BZ, et al. Histopathological changes of *Bemisia tabaci* infected by *Beauveria bassiana* [J]. *Plant Protection*, 2006, 32 (3): 52–54. [刘召, 雷仲仁, 花保祯, 等. 烟粉虱感染白僵菌后的组织病理变化 [J]. 植物保护, 2006, 32 (3): 52–54]
- Ren J, Lei ZR, Zhang LJ, et al. The occurrences and damages of *Frankliniella occidentalis* in Beijing municipality [J]. *China Plant Protection*, 2006, 26 (5): 5–8. [任洁, 雷仲仁, 张令军, 等. 北京地区西花蓟马发生为害调查研究 [J]. 中国植保导刊, 2006, 26 (5): 5–8]
- Rangel DEN, Braga GUL, Flint SD, et al. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produce on insects and artificial substrates [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2004, 87: 77–83.
- Song RM, Wang YB, Li RJ, et al. Study on histopathological changes of *Laphygma exigua* (Hübner) infected by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2006, 21: 171–174. [宋入梅, 王云滨, 李瑞军, 等. 甜菜夜蛾感染白僵菌、绿僵菌后的病症及组织病理学变化 [J]. 华北农学报, 2006, 21: 171–174]
- Toledo AV, de Remes Lenicov AMM, et al. Histopathology caused by the entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, in the adult planthopper, *Peregrinus maidis*, a maize virus vector [J]. *Journal of Insect Science*, 2010, 10 (35): 1–10.
- Vestergaard S, Butt TM, Bresciani J, et al. Light and electron microscopy studies of the infection of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1999, 73: 25–33.
- Wu SY, Gao YL, Zhang YP, et al. An entomopathogenic strain of *Beauveria bassiana* against *Frankliniella occidentalis* with no detrimental effect on the predatory mite *Neoseiulus barkeri*: Evidence from laboratory bioassay and scanning electron microscopic observation [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9 (1): e84732.
- Wang XH, Huang DZ, Yang ZQ, et al. Microscopic observations of infection process of *Beauveria bassiana* on the cuticle of *Apriona germari* larvae [J]. *Science of Sericulture*, 2009, 35 (2): 374–378. [王晓红, 黄大庄, 杨忠岐, 等. 白僵菌感染桑天牛幼虫致病过程的显微观察 [J]. 蚕业科学, 2009, 35 (2): 374–378]
- Xiong Q, Xie YP, Zhu YM, et al. Morphological and ultrastructural characterization of *Carposina sasakii* larvae (Lepidoptera: Carposinidae) infected by *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales: Clavicipitaceae) [J]. *Micron*, 2013, 44: 303–311.
- Yuan SY, Kong Q, Li X, et al. Toxicity of *Beauveria bassiana* against adult and nymph of *Gynaikothrips ficorum* [J]. *Forest Pest and Disease*, 2013, 32 (4): 21–23. [袁盛勇, 孔琼, 李珣, 等. 球孢白僵菌对榕母管蓟马成虫和若虫的毒力 [J]. 中国森林病虫, 2013, 32 (4): 21–23]
- Yang XJ, Teng XJ. Study on cryostat technique [J]. *Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2014, 13 (23): 2002–2004. [杨秀静, 滕孝静. 冰冻切片技术经验探讨 [J]. 临床和实验医学杂志, 2014, 13 (23): 2002–2004]
- Yu DQ, Tian YX, Chen X, et al. Anti-slice escaping effect of chrome alum gelation in brain frozen section [J]. *Journal of Dalian Medical University*, 2009, 31 (5): 616–617. [于德钦, 田余祥, 陈熙, 等. 明胶硫酸铬钾在脑组织冰冻切片中的防脱片作用 [J]. 大连医科大学学报, 2009, 31 (5): 616–617]
- Zhao CY, He YR, Zhong F, et al. Analysis of cuticular hydrocarbons of *Frankliniella occidentalis* Chinese [J]. *Journal of Applied Entomology*, 2011, 48 (3): 536–541. [赵成银, 何余容, 钟锋, 等. 西花蓟马表皮碳氢化合物成份分析 [J]. 应用昆虫学报, 2011, 48 (3): 536–541]
- Zhang F, Li S, Xiao D, et al. Progress in pest management by natural enemies in greenhouse vegetables in China [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, 48 (17): 3463–3476. [张帆, 李姝, 肖达, 等. 中国设施蔬菜害虫天敌昆虫应用研究进展 [J]. 中国农业科学, 2015, 48 (17): 3463–3476]
- Zhang YJ, Wu QJ, Xu BY, et al. Occurrence and damage in Beijing of an invasive pest-western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* [J]. *Plant Protection*, 2003, 29 (4): 58–59. [张友军, 吴青君, 徐宝云, 等. 危险性外来入侵生物—西花蓟马在北京发生危害 [J]. 植物保护, 2003, 29 (4): 58–59]
- Zhang YM, Xie YP, Xue JL, et al. Histopathological changes in *Dendrolimus tabulaeformis* (Lepidoptera: Lasiocampidae) infected by *Beauveria bassiana* [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2011, 54 (5): 531–539. [张艳梅, 谢映平, 薛皎亮, 等. 油松毛虫受球孢白僵菌感染的组织病理学变化 [J]. 昆虫学报, 2011, 54 (5): 531–539]