

# 甜菜夜蛾感染白僵菌、绿僵菌后的病症 及组织病理学变化

宋入梅, 王云滨, 李瑞军, 董建臻, 李 静, 王瑞晓

(河北农业大学 植物保护学院, 河北 保定 071001)

**摘要:**甜菜夜蛾感染白僵菌和绿僵菌后, 虫体颜色及外部形态均发生相应变化。其组织切片观察研究表明: 两种供试菌株的致病过程基本一致, 只在侵染速度上有所差异: 绿僵菌侵染速度较快, 而且其破坏裂解组织的程度远大于白僵菌。白僵菌菌株 015 处理 24 h 后肠道内未见萌发的孢子, 组织没有发现变化; 48 h, 附着于甜菜夜蛾体壁外的孢子开始萌发; 72 h 体腔内明显的菌丝段, 各组织器官均受到感染, 之后进入体内的菌丝不断增殖, 脂肪体、肌肉组织、消化道发生病变解体; 120 h 后, 菌丝突破虫体, 在体外形成菌丝层。较之于绿僵菌菌株 060, 72 h 时菌丝充满胸腔, 肠壁细胞也受到严重侵染, 肠腔内出现菌丝, 部分菌丝突出体表, 菌株 086, 96 h 时各组织均解体。

**关键词:** 甜菜夜蛾; 白僵菌; 绿僵菌; 外部症状; 组织病理

中图分类号: S433.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2006)增刊-0171-04

## Study on Histopathological Changes of *Laphygma exigua* (Hubner) Infected by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*

SONG Ru\_mei, WANG Yun\_bin, LI Rui\_jun, DONG Jian\_zhen, LI Jing, WANG Rui\_xiao

(College of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China)

**Abstract:** *Laphygma exigua* Hubner was infected by two isolates of *Metarhizium anisopliae* and two isolates of *Beauveria bassiana*. There were some changes in color and morphology on the *Laphygma exigua* Hubner. The result of Paraffin sections showed that the invasion process by *Beauveria bassiana* were similar by *Metarhizium anisopliae*. But the invasion speed was different. The invasion speed of *Metarhizium anisopliae* was faster than *Beauveria bassiana*. The spore in the intestine was not burgeon and the organization of *Laphygma exigua* Hubner was not change at 24h. After 48h, the spore was burgeon on the cuticular. By 72h, the hypha could be observed in the blood and began to reproduced in hemocoel. And then, the fattiness, muscle tissue and alimentary tract carry on a series of pathological changes. The hypha emerged through the cuticle and formed hyphal layer on the surface of the dead insect 120h postinoculation. The hypha emerged through the cuticle when *Laphygma exigua* Hubner was infected by *Metarhizium anisopliae* 060 at 72h. By 96h, the organization of *Laphygma exigua* Hubner by *Metarhizium anisopliae* 086 was destroyed entirely.

**Key words:** *Laphygma exigua* Hubner; *Beauveria bassiana*; *Metarhizium anisopliae* symptom histopathology

甜菜夜蛾(*Laphygma exigue* Hubner)属鳞翅目(Lepidoptera)夜蛾科(Nocuidae),是世界性分布的多食性害虫。由于该虫对化学农药抗药性的不断增强,近年来在我国南北方许多地区连续暴发成灾<sup>[1~4]</sup>。因此,寻求和完善对其的生物防治措施已

成当务之急。

白僵菌(*Beauveria bassiana*)和绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)是虫生真菌中的重要种类,在虫生真菌的利用中占有重要地位。应用白僵菌等可侵染并引起甜菜夜蛾死亡<sup>[5,6]</sup>。但是,目前有关白僵菌和

收稿日期:2006-08-10

基金项目:河北省农业病虫害生物防治工程技术研究中心;河北省科技厅资助项目(03220185D)

作者简介:宋入梅(1980-),女,河北武安人,硕士,主要从事害虫生物防治方面的研究工作,现工作单位为河北省邯郸市畜牧水产局;董建臻为通讯作者。

绿僵菌感染甜菜夜蛾后的病症及组织病理学变化还未见报道。

我们利用本实验室筛出的白僵菌、绿僵菌菌株对甜菜夜蛾进行处理,并对其感病后的症状及组织病理学进行了研究,旨在探明白僵菌、绿僵菌对寄主的侵染机制,及为开发相关微生物杀虫剂提供技术资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试菌株 白僵菌 015 号、038 号;绿僵菌 060 号、086 号均为本实验室保存菌种

1.1.2 供试虫源 甜菜夜蛾系室内人工饲养的 3~4 龄初幼虫。

### 1.2 方法

1.2.1 孢子悬浮液的配制 将供试菌株先接种于 PDA 培养基上,25℃恒温培养 7 d,然后用 0.1% 吐温-80 的无菌水配制成浓度为  $4.0 \times 10^8$  的分生孢子悬浮液备用。

1.2.2 试虫的处理 将新鲜的甘蓝叶片用 2 cm 的打孔器打成圆片,在浓度为  $4 \times 10^8$  孢子/mL 的菌悬液中浸蘸至完全湿润,自然风干后取 20 片移入养虫盒中饲喂。在处理 12, 24, 48, 72, 96 h 后依次取样<sup>[7]</sup>。

1.2.3 石蜡切片的制备<sup>[8,9]</sup> 样品在包氏(Boume)固定液<sup>[10]</sup>中固定 18~24 h,经 50% 及 70% 的酒精冲洗数次,待组织脱去黄色固定液后保存于 70% 的酒精中。经系列浓度酒精脱水处理,苏木精-伊红(H.E)染色。常规方法制作切片(厚度为 5~8 μm)。Olympus 光学显微镜观察照相。

## 2 结果与分析

### 2.1 甜菜夜蛾感染白僵菌后的外部症状

幼虫接种白僵菌 015, 038 后,在染病初期,对碰触的反应、取食行为及外表与健康试虫无差别。接种 015 菌株 24~48 h,体色逐渐出现不均匀变化,即腹部颜色由绿色变为淡黄绿色,038 菌株约在 48 h 后出现此症状;随后,幼虫取食减少,对碰触反应迟钝;虫体渐变为淡黄色,略肿胀,出现僵直症状,此时部分幼虫死亡。经 25℃保湿培养 72~96 h 后,虫体长出白色菌丝,继续保湿培养,虫体将被白色分生孢子覆盖。

### 2.2 甜菜夜蛾感染绿僵菌后的外部症状

幼虫接种绿僵菌 060, 086 后,接种 060 菌株 24 h 后,表现出感病症状,虫体活动减弱,部分试虫还不停的抽搐、翻腾,头部扬起亦左右晃动,体色逐渐由绿色变为灰色,086 菌株在 24~48 h 后出现此症状;随后,虫体呈灰褐色,出现僵直状死亡,保湿培养,虫体长出白色菌丝,后被绿色分生孢子覆盖。

### 2.3 甜菜夜蛾的组织病理变化

图 1- A, B, C, E, I, L 为甜菜夜蛾感染白僵菌菌株后各组织病理变化;图 1- G, K, M, N 为甜菜夜蛾感染绿僵菌菌株后组织病理变化;图 1- D, F, H, J 为健康甜菜夜蛾体壁、肠壁细胞、肌肉组织、腺体组织。

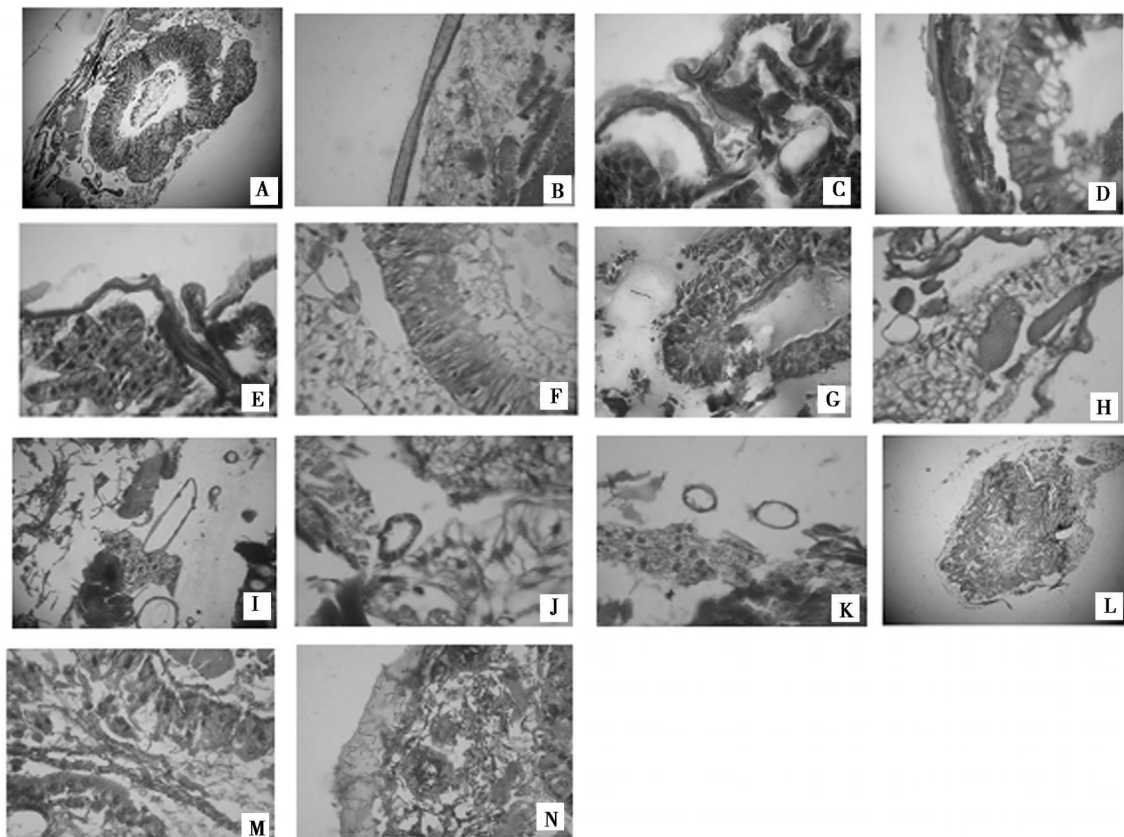
组织切片观察表明:采用饲喂接菌法处理的 3~4 龄甜菜夜蛾,取食带菌甘蓝叶片后,有食入消化道的孢子(图 1- A),48 h 未见萌发,但能见到普遍附着于甜菜夜蛾身体外表皮的孢子开始萌发侵入,入侵点体壁颜色加深(图 1- B),表明由于酶和机械压力作用,被侵染的甜菜夜蛾幼虫上表皮发生降解,极少数芽管进入内表皮,出现皮细胞层与表皮分离现象(图 1- C),进入体腔内侧的菌丝体对寄主组织没有选择性。菌丝最初在侵入部位的血腔中生长,然后侵入临近的脂肪体、肌肉。随着菌丝体在虫体内扩展,消化道、丝腺等相继被侵染,最后受侵染的各组织器官均发生明显的病理变化,感病昆虫不久死亡。

正常甜菜夜蛾体壁由表皮层、皮细胞层、底膜组成(图 1- D)。感病后皮细胞层与表皮层发生分离,整个体壁分层不明显(图 1- E),染菌后脂肪体明显变形,结构松散,出现空泡,边缘呈缺刻状,并逐渐缓和模糊,释放出葡萄状的脂肪颗粒,这些颗粒又逐渐被溶解,正常的消化道肠壁细胞排列整齐、规则,紧贴肠壁的肌肉层分布(图 1- F)。被侵染的肠壁细胞萎缩,与肠壁肌肉层分离并出现破裂,部分血细胞随血液流入血腔,消化道逐渐解体,肠腔内混浊(图 1- G)。正常肌肉结构紧密,成条形或块状(图 1- H),被侵染后初期出现裂隙,并不断分离成碎块,然后溶解(图 1- I)。正常的丝腺外层细胞排列紧密、中空且有较多分泌物(图 1- J),染菌后丝腺外层的细胞脱落解体(图 1- K)。最后整个虫体组织解体,各组织变得模糊不清(图 1- L)。

白僵菌菌株(015, 038)与绿僵菌菌株(060, 086)对甜菜夜蛾的侵染过程基本相似,但绿僵菌侵染速度较快,而且其破坏裂解组织的程度远大于白僵菌。

接种白僵菌 015, 48 h 时, 附着于甜菜夜蛾体壁外的孢子开始萌发, 而此时接种绿僵菌 060, 以可见侵入组织的菌丝体; 接种白僵菌 015, 72 h, 体腔内明显的菌丝段, 各组织器官均受到感染, 接种绿僵菌

060, 72 h 时菌丝充满血腔, 肠壁细胞也受到严重感染, 肠腔内出现菌丝, 部分菌丝突出体表(图 1- M), 接种绿僵菌 086, 96 h 时各组织均解体(图 1- N)。



A. 食入消化道的孢子 (015 48h); B. 孢子附着于甜菜夜蛾体壁(015, 48h); C. 皮细胞层与表皮分离 (015, 72h); D. 正常甜菜夜蛾体壁; E. 感病后皮细胞层与表皮层分离 (015, 72h); F. 正常甜菜夜蛾肠壁细胞; G. 被侵染后肠壁细胞萎缩 消化道逐渐解体 (086, 72h); H. 正常肌肉组织; I. 正在被侵染的肌肉组织 (038, 72h); J. 正常甜菜夜蛾腺体组织; K. 菌后丝腺外层的细胞脱落解体 (060, 72h); L. 最后各组织变得模糊不清 (015, 120h); M. 被侵染的肠腔组织 (060, 72h); N. 各组织解体 (086, 96h)

A. The spore in the digestive tube (BD\_B 015, 48h); B. The spore cling to the body wall of *Laphygma exigua* Hubner (BD\_B 015, 48h); C. The separate epidermis and cuticle (BD\_B 015, 72h); D. The body wall of healthy *Laphygma exigua* Hubner; E. The separate epidermis and cuticle of infected *Laphygma exigua* Hubner (BD\_B 015, 72h); F. The gut cells of healthy *Laphygma exigua* Hubner; G. The gut cells atrophy and the digestive Tube disorganization (086, 72h); H. The muscle tissue of healthy *Laphygma exigua* Hubner; I. The infected muscle tissue by *Beauveria Bassiana* (038, 72h); J. The gland tissue of healthy *Laphygma exigua*; K. The disorganized cells around the glands infected by *Metarhizium* Sorokin (060, 72h); L. The unorderly tissue in the end (015, 120h); M. The gut tissue infected by *Metarhizium* Sorokin (060, 72h); N. All the disorganized tissue (086, 96h)

图 1 健康甜菜夜蛾组织切片及感染白僵菌、绿僵菌后的甜菜夜蛾组织病理学变化组图

Fig 1 The contrast between changes of symptom histopathology on the *Laphygma exigua* Hubner infected by two isolates of *Metarhizium anisopliae*, two isolates of *Beauveria bassiana*, and the tissue sections of healthy *Laphygma exigua* Hubner

### 3 讨论

白僵菌、绿僵菌均隶属于半知菌亚门(Deuteromycotina)、丝孢纲(Hyphomycetales), 而从属于不同的属, 即: 白僵菌属(*Beauveria*) 和绿僵菌(*Metarhizium*) 属。病原菌侵染虫体的途径主要是通过表皮, 当以浸叶法接种时幼虫的胸、胸足首先被病原菌侵

染。幼虫取食过程中主要以足接触叶片上的分生孢子, 足末端的趾钩有助于孢子的存留, 在较密集的孢子条件下, 成为病原菌侵入的突破点<sup>[9]</sup>。食入虫体内的分生孢子不能萌发, 可能是由于鳞翅目昆虫消化道内的碱性消化液不利于嗜酸性真菌孢子的萌发<sup>[11]</sup>。

在菌丝段大量充斥的虫体内, 其分布呈现为体

腔外周密度大,内部密度小。且菌丝段分两类:一类为小型颗粒或短棒状,直径小于血细胞一般位于血淋巴内;另一类为长丝状,长度远大于血细胞,通常分布在固态组织周围,由此推测菌丝段主要是在甜菜夜蛾幼虫血淋巴中繁殖,小型菌丝段随血液循环到达各组织器官外围后,菌丝段伸长,待虫体死亡后逐渐侵入到各固态组织器官内。

Veen<sup>[12]</sup>和Schabel<sup>[13]</sup>的试验证实绿僵菌可经口感染寄主昆虫,未能确认消化道入侵。而王音等<sup>[8]</sup>研究发现绿僵菌可在小菜蛾肠道内萌发,消化道是绿僵菌入侵的次要途径。有关真菌从消化道侵入血腔的报道很少<sup>[14]</sup>,白僵菌对某些昆虫存在这种入侵途径已得到肯定<sup>[15]</sup>。本实验研究发现侵入消化道的分生孢子,但未见其萌发。

病原菌对寄主的入侵过程是寄主与病原菌之间相互抑制,相互斗争的过程,涉及面广、入侵机理复杂,对其致病机理的探讨仍需从它与寄主间的相互作用出发,至今尚有许多问题未得到解决,仍需进一步研究,以便更有效的开发和利用这一宝贵的生物资源。

# 参考文献:

[1] 罗礼智,曹雅忠,江幸福.甜菜夜蛾发生危害特点及其趋势分析[J].植物保护,2000,6(3):37-39.  
[2] 刘永杰.甜菜夜蛾泰安郊区田间种群对杀虫剂的抗性水平监测[J].华东昆虫学报,2004,13(2):72-75.  
[3] 屈振刚,王金耀,祝丽英.管侧沟茧蜂的寄主对甜菜夜

蛾幼虫取食和发育的影响[J].华北农学报,2005,20(2):93-96.

[4] 郭线茹,李为争,原国辉,等.甜菜夜蛾成虫对黑杨萎蔫叶片挥发性物质的触角电位反应[J].华北农学报,2002,17(3):118-123.  
[5] 李运帷.白僵菌的生产和应用[M].北京:中国林业出版社,1981.  
[6] 陈昌洁.松毛虫综合管理[M].北京:中国林业出版社,1990.  
[7] 张仙红,李文英.菜青虫感染蜡蚧轮枝菌后的组织病理变化[J].昆虫学报,2003,46(5):655-659.  
[8] 王音,雷仲仁.小菜蛾感染绿僵菌后的病征及组织病理变化[J].中国生物防治,20(3):156-160.  
[9] 张爱女.亚洲玉米螟感染白僵菌后组织病理学研究[J].生物学通报,1994,10(4):151-156.  
[10] 蒲蛰龙.害虫生物防治的原理与方法[M].北京:科学出版社,1984:150-160.  
[11] Pu Z L, Li Z Z. 1996: The Fungus of Insect[M]. Hefei: Anhui Sciencetech Press, 93-111.  
[12] Veen K H. Oral infection of second instar nymphs of *Schistocerca gregaria* by *Metarrhizium anisopliae* [J]. J Invertebr Pathol, 1966, 8: 254-256.  
[13] Schabel H G. Oral infection of *Hylobius pales* by *Metarrhizium anisopliae* [J]. J Invertebr Pathol, 1976, 27: 377-383.  
[14] 蒲蛰龙,李增智.昆虫真菌学[M].合肥:安徽科技出版社,1996:99.  
[15] Gabriel B P. Fungus infection of insects via the alimentary tract [J]. J Invertebr Pathol, 1959, 319-330.