

绿僵菌对昆虫的入侵机理*

王海川 尤民生

(福建农业大学植保系 福州 350002)

关键词 绿僵菌, 寄主, 入侵机制

分类号 Q939.96, S182 文献标识码 C 文章编号 ISSN-0253-2654(1999)-01-71-73

绿僵菌 [*Metarhizium* (Metsch.) Sorokin] 是一种有效的杀虫真菌, 利用它来防治害虫的研究与实践已愈百年^[1]。据不完全统计, 全世界约有 200 多种昆虫能被这种真菌感染致死, 它致病力强, 效果好, 对人, 畜, 作物无毒害, 和白僵菌一样, 是一种当前世界上研究和应用最多的虫生真菌之一, 利用绿僵菌对害虫进行微生物防治具有广阔的前景。但是同其它真菌杀虫剂一样, 绿僵菌的致死时间比化学杀虫剂长, 因而影响了它效果的发挥, 为挖掘及有效地应用这种有潜力的微生物制剂, 国外已有许多国家对绿僵菌入侵机理进行了深入的研究, 如酶的作用、和入侵有关的基因(如 *Pil*)的克隆等。由于目前有关绿僵菌研究和应用主要集中在金龟子绿僵菌, 因此, 本文就以金龟子绿僵菌为代表, 就绿僵菌对昆虫的入侵机理研究进展作一综述。

1 侵染方式

和其它大部分病原真菌一样, 绿僵菌的分生孢子首先附着于寄主体表, 一旦能正常萌发生长, 则产生入侵菌丝, 发生入侵, 最终导致寄主死亡。在这个过程中, 绿僵菌形成特殊结构(如附着胞等), 同时分泌各种相应的酶(如几丁质酶等), 破坏寄主体表, 侵入寄主体内, 与此同时需要克服昆虫体表上的某些物质的抑制作用以及寄主体内的一系列免疫活动^[2]。

2 入侵

虫生真菌穿透寄主表皮的过程包括酶的分泌和物理(机械)力的产生两个部分。

2.1 附着胞 附着在寄主表皮上的分生孢子萌发后, 形成芽管(germ tube), 芽管对表皮有很强的定向性。穿透昆虫表皮需要产生一系列精确的识别结构, 如, 附着胞、侵染钉、穿透菌丝和片, 使病原菌在寄主表皮上

一个小的范围内有效的集中物理(机械)和溶解能量, 这种结构的产生有助于病原菌的入侵。绿僵菌就具有在寄主体表产生决定其附着结构——附着胞的能力, 如, 金龟子绿僵菌的芽管在穿透表皮之前先分化形成一个附着胞, 内含大量的线粒体、高尔基体、内质网和核糖体, 代谢活动旺盛, 它可旺盛地合成和分泌水解酶。附着胞经过一段时间的膨大后, 就会形成与感染密切相关的结构——侵染钉(infection pegs), 体壁的穿透正是在此处发生的^[3]。但并不是所有的绿僵菌都会产生附着胞, Butt 等^[4]在研究绿僵菌在蚜虫和叶甲科甲虫表皮上萌发行为的过程中发现, 绿僵菌在甲虫体表产生的附着胞比蚜虫的多, 没有附着胞产生, 萌芽管同样也能侵入表皮。球孢白僵菌侵染马铃薯甲虫时也形成附着胞样的结构, 但在侵染棉铃虫时却没有观察到附着胞的形成^[7]。附着胞的产生和营养条件、pH 值等也有一定的关系^[5]。此外, 绿僵菌也可在坚硬的表面如玻璃等上产生附着胞^[5, 6]。

2.2 酶 昆虫的表皮主要由蛋白质、几丁质和脂类构成, 其中, 主要成分是蛋白质, 几丁质微纤维(chitin microfibrils)次之, 占 30%, 是虫生真菌最初侵染和入侵的位点。产生各种胞外酶是病原真菌具有的降解寄主体表的策略之一。大部分真菌在入侵的时候产生相应的酶(蛋白质、几丁质和脂类降解酶)来降解这些物质, 以便菌丝侵入, 同时, 为菌丝的进一步生长提供营养物质。Raymond 等^[7]把绿僵菌接到含有蟑螂表皮的培养基内, 试图揭示绿僵菌在寄主体表时的胞外蛋白质的

* 福建省科委、福建省百千万人才工程科研启动基金资助

1997-11-25 收稿, 1998-05-21 修回

合成及分泌情况,通过实验发现,绿僵菌分泌到培养基中的蛋白质至少有42种,而且对放线菌素D(actinomycin D)是敏感的,其中大部分蛋白质是酸性的和“糖原结合酶”(glycoconjugates),这些蛋白质的NH₂-终端的主要基本蛋白的序列和类枯草杆菌蛋白酶(subtilisin-like proteinase) Prl的序列一致。

目前,研究最多的是Prl(subtilisin-like protease)和几丁质酶(chitinase)。Prl可溶解蛋白质性质的昆虫表皮,这有助于菌丝的入侵,并为菌丝的进一步生长提供营养。绿僵菌产生Prl的机制有两种,通常的一种是碳代谢的胁迫或去胁迫机制,另一种是碳源(表皮)诱导机制。几丁质酶(chitinase)是一个和虫生真菌的毒力有关的因素,Raymond等^[8]发现,在感染和入侵初期,绿僵菌分泌到寄主表皮几丁质酶的量很低,但在蛋白质被降解的部位几丁质酶的含量却很高,这说明与底物(几丁质)的可接触能力决定了病原菌几丁质酶的产生。也有资料表明几丁质酶含量高的球孢白僵菌菌株致病力却很低,并认为缺乏某种酶并不是造成菌丝在体表无定向生长的真正原因^[9]。另外,还有人发现球孢白僵菌无毒菌株比毒性菌株产生更多的蛋白酶。

3 毒素的合成

目前,人们认为,真菌毒素可能是通过干扰寄主细胞的免疫系统而起作用的,而且在病原菌对寄主的致病过程中起着越来越重要的作用。绿僵菌在生长过程中会产生一系列的“环状六肽毒素”(cyclic hexapeptide toxins),又称“破坏素”(destruxin),Samuels等^[10]发现,把破坏素混合物注入*Manduca sexta*的五龄幼虫体内可立刻引起虫体瘫痪及肌肉松弛,并且认为,破坏素可能具有致病或入侵的作用。但目前这些毒素在致病过程中的作用机制尚不十分清楚,只发现纯的这种毒素对寄主有免疫压力(immunosuppression)、肌肉麻痹(muscular paralysis)和损害马氏管(impairment of Malpighian)的功能。并不是所有的绿僵菌都能产生这类毒素,但对鳞翅目有很高的毒力的菌株常产生这类毒素^[11]。

4 有关基因

近五年来,人们开始致力于研究虫生真菌的有关基因,试图发现有价值的基因,从而增强其致病力,加快杀虫时间,以便更好地利用这一有效的生物制剂。

4.1 Prl蛋白酶基因 Prl蛋白酶基因是第一个由St

Leger等^[12]克隆到的和编码与绿僵菌致病力有关的Prl(chymoelastase)的基因。Prl蛋白酶在其活性部位有基本组氨酸的丝氨酸内蛋白酶,有一个亲水的氨基酸位点和至少五个亲水的肽链位点,可作用于很多蛋白质,如胶原蛋白、酪蛋白、弹性蛋白等。Prl通常和寄主表皮带负电荷的组分相结合,只有在可溶性的肽降解到大约5肽时,其活性位点才和感受态的肽结合。昆虫表皮上的几丁质被由蛋白质亚单位组成的鞘所包围,用Prl预处理表皮可增强随后的几丁质酶的活性,而且Prl降解蛋白质是使几丁质成为感染期间诱导几丁质酶产生的因素。目前,Raymond等已开始和Dixon合作,准备在植物中选用绿僵菌的基因。

4.2 毒素基因 毒素基因是编码“环状六肽毒素”合成酶的基因。通过对不同来源的绿僵菌的“破坏素”合成酶的基因序列分析发现,这个基因有一个共同的结构即在肽毒中对每一个氨基酸有一个酶化的“区域”(domain),在每一个“区域”内,有许多保守的“核心序列”(core sequences)^[11]。

4.3 其它基因 a.钝化寄主防御能力的基因,如编码绿僵菌中干扰寄主细胞防御反应的毒化细胞的RNA酶就属于这一类基因。b.信号传递基因,这类基因与病原菌对寄主的直接或间接识别有关,现已发现,编码调节GTP-腺苷酸环化酶、酪氨酸蛋白酶激酶、Ca²⁺/CaM及cAMP蛋白激酶等的基因就属于这类。St Leger等^[12]认为,Ca²⁺在萌芽管的生长中起着重要作用。

5 寄主的抵御作用

5.1 寄主体表物质的抑制作用 昆虫体表上有许多脂肪酸,其中能抑制孢子萌发的是一些短链脂肪酸(C₄-C₁₂),尤以辛酸(caprylic acid)和癸酸(capric acid)为主,它们对真菌的作用是抑制性的而非杀真菌剂,可能是通过破坏分生孢子膜的选择透性或进入细胞内,使孢子萌发代谢紊乱(影响酶的分泌和合成)而达到抑制的目的^[7]。

5.2 表皮的阻抑作用 在被真菌所分泌的蛋白酶降解之前,昆虫表皮蛋白对绿僵菌有抵抗作用,寄主的抵抗作用决定于寄主对病原分泌的蛋白酶活性的抑制能力。实验表明,在感染之前,Prl只限存在于真菌结构附近。昆虫表皮的阻抑机制可能有以下四个方面:(1)表皮具有分子筛的作用,阻挡酶的溶入;(2)结合到寄主表皮的不同酶可限制酶对表皮的降解程度;(3)表皮中

的各种成分可抵抗酶的降解或保护表皮中易被酶化的成分; (4) 寄主物质可抑制病原的水解酶。许多和阻碍病原菌对寄主表皮降解有关的因素可能是自发或是诱导产生的, 病原物分泌的酶可能和诱导寄主产生抗性的信号有关。

5.3 寄主的免疫反应 寄主体内的血细胞有颗粒细胞及浆细胞等, 对侵入体内的异物均有抵御和识别作用, 当异物侵入时, 这些颗粒细胞及浆细胞等几种细胞会识别、附着、吞噬异物, 并分泌抗微生物物质, 使用大量的血细胞对异物进行节化 (nodulation)、被囊化 (encapsulation) 作用及与酚类氧化酶有关的黑化反应和溶菌酶等。如当把绿僵菌大孢变种注入金龟子幼虫后, 免疫种铜绿丽金龟和华北大黑鍬金龟的幼虫体内形成典型结构的被囊体, 其内部是黑化的不能萌发的绿僵菌孢子, 但敏感种白金花金龟的幼虫体内则形成松散的被囊体, 孢子可顺利地萌发和生长。当体壁受伤流出体液时, 伤口也会产生黑化作用^[13]。另外, 与黑化反应有关的黑色素 (melanin) 具有保护寄主免受酶攻击的作用^[14]。在对病原物的识别过程中, 真菌胞壁的成分、寄主体内的调理分子 (opsonic molecules) 和血细胞细胞膜的成分起着关键性的作用。

血细胞对病原物的抵御作用又受病原物有毒代谢物的影响, 如, 当把 *Aspergillus niger* 的孢子悬浮液和破坏素 E 注入 *Galleria mellonella* 的幼虫体内后, 经解剖发现, 用孢子悬浮液处理过的幼虫体内的血细胞的数量比用毒素处理过的少, 血细胞的被囊化作用也降低了, 24h 后, 孢子的萌发率也比用毒素处理过的低, 而且芽管的生长速度比用毒素处理过的低, 绿僵菌的破坏素 (destruxin) 对血细胞也有同样的影响^[2]。另外, Dillon 等^[15]还发现, 通过消化道感染沙漠蝗的绿僵菌会受到由寄生于肠体内的细菌所分泌的抗真菌毒素的影响。

绿僵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, 所涉及的面很广, 其入侵机理也相当复杂, 远不止以上所涉及的几个方面, 还有许多与入侵有关的问题尚未得到解答, 如由于附着胞可在翅表、玻璃以及体表等硬物上形成, 但在节间膜上未见形成, 这是否是病原物在长期进化过程中形成的一种对付昆虫几丁质化表皮的策略; 随寄主龄期的增加, 寄主对病原物的抵抗必然会增强, 但这和寄主体内的一些生理生化指标如酚氧化酶、过氧化物酶、过氧化氢

酶、血细胞等的量的变化之间的关系如何; 寄主血细胞量的锐减是否和造血器官的破坏有关; 寄主血细胞为何只能包围侵入的菌丝段, 但不能消除它; 血细胞是如何识别异物的, 血细胞包围异物是发生在黑化作用之前还是之后, 黑化作用是否是血细胞识别及包围异物的信号机制; 以及它们之间的理化反应如何; 血细胞是否会分泌毒素而抑制菌丝段的生长; 绿僵菌在侵染过程中会产生各种毒素, 但这些毒素的作用位点在什么地方, 是通过什么方式起作用的等等。这些问题需要进行更深入细致地研究, 以便更有效地开发和利用这一宝贵的生物资源。

参 考 文 献

- [1] 樊美珍, 郭超. 中国虫生真菌研究与应用, 1993, 3: 14~20.
- [2] Vey A, Boucias D, Quiot J M *et al.* SIP (Society for Invertebrate Pathology), 1992, 5.
- [3] 翟锦彬, 黄秀梨, 许萍. 微生物学通报, 1995, 22(1): 45~48.
- [4] Butt T M, Abeahin L, Clark S J *et al.* Mycological Research, 1995, 99(8): 945~950.
- [5] 樊美珍 李增智. 安徽农业大学学报, 1994, 21(2): 123~130.
- [6] Raymond J, St Leger, Tariq M *et al.* Frimental Mycology, 1989, 13: 274~288.
- [7] Raymond J, St Leger, Lokesh Joshi *et al.* Mycol Res, 1995, 99(9): 1034~1040.
- [8] Raymond J, St Leger, Likesh Joshi *et al.* Applied and environmental microbiology, 1996, Mar. 907~912.
- [9] Sue Pekrul, Grula E A. J of invertebrate pathology, 1979, 34: 238~247.
- [10] Samuels R I, Charnley, A K, Reymolds S E. Mycopathotogia, 1988, 104: 51~58.
- [11] Bailey A M, Kershaw M J, Reynold CAK *et al.* SIP (Society for Invertebrate Pathology), 1996, 5.
- [12] St. Leger R J, Butt T M, Staples R C *et al.* J of General Microbiology, 1990, 136: 1779~1789.
- [13] 蒲蛰龙 李增智. 昆虫真菌学. 安徽: 安徽科技出版社, 1996, 93~111.
- [14] St. Leger R J, Cooper R M and Charley A K. Journal of invertebrate pathology, 1988, 52: 459~470.
- [15] Dillon R J, Charnliy A K. Mycopathotogia, 1986, 96: 59~66.