

褐飞虱体内酵母类共生菌的形态观察

陈法军^{1,2} 张珏锋¹ 夏湛恩¹ 吕仲贤¹ 俞晓平^{1*}

1. 浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所 杭州 310021, E-mail: chenfj@ioz.ac.cn; chen-fajun@163.com

2. 浙江大学农业与生物技术学院 杭州 310029

摘要 试验采用冷冻切片技术结合显微摄像系统观察研究了褐飞虱雌成虫体内酵母类共生菌的形态特性和在寄主虫体内的存在状态。光学显微镜观察证实, 褐飞虱雌成虫的头部和胸部均未观察到共生菌, 在其腹部脂肪体中却发现大量酵母类共生菌的存在, 且有大量的菌胞出现。菌胞已经成为褐飞虱特有的细胞器, 其发育可划分为发育初期、共生菌增殖适应期、对数增殖期(高峰期)、释放期和衰竭期 5 个阶段。按照形态划分, 褐飞虱体内的酵母类共生菌有 4 大类型, 即长梭形、杆状、卵形和球状。其中, 长梭形和杆状个体最多、占绝大多数, 卵形和球状个体很少见。此外, 还发现具假隔膜梭形和不规则共生菌的存在。同时观察到该类共生菌通过多边芽殖进行无性繁殖, 且以顶端芽殖(包括两端芽殖)为主。

关键词 褐飞虱, 酵母类共生菌, 形态特性, 菌胞。
中图分类号 Q964

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* Stål 是我国及东南亚水稻产区的主要害虫之一, 属 r- 对策、迁飞性害虫, 多年来给我国水稻生产造成极大危害(李汝铎等, 1996)。在对抗性水稻的危害过程中, 褐飞虱很容易产生新的致害性种群, 即生物型(俞晓平, 1990; 肖英方等, 1998; 李青等, 1999; 周亦红和韩召军, 2003)。至今, 在我国和东南亚稻区已相继出现了多个生物型褐飞虱种群, 如生物型、和 Mindanao 型等, 从而使大面积推广种植的抗性品种水稻, 如 IR 系列、Mudgo、ASD7、Rathu Heenati、Babawee 等失去抗性, 这给抗性品种的选育和推广构成严重的威胁。

与多数刺吸危害的同翅目昆虫如蚜虫和叶蝉一样, 褐飞虱体内也普遍存在共生菌, 该类共生菌属于子囊菌亚门 Ascomycotina, 核菌纲 Pyrenomycetes 的 *Candida* 属(Nasu, 1963; Chen et al., 1981a; Cheng & Hou, 1996, 2001), 即通常所讲的酵母类共生菌(Yeast-like endosymbiote)。国外早在 20 世纪 60 年代就有有关褐飞虱体内酵母类共生菌的形态描述(Nasu, 1963), Hook & Griffith (1980) 观察还发现, 酵母类共生菌在寄主褐飞虱腹部脂肪体细胞中形成其特有的器官——菌胞(Mycetocyte)。从上世纪 80 年代开始, 我国台湾地区也陆续报道了褐飞虱体内酵母类共生菌的光学显微镜和电子显微镜观察结果(Chen et al., 1981a, 1981b; Cheng & Hou,

1996, 2001)。Cheng & Hou (2001) 还证实了褐飞虱雌成虫腹部脂肪体内菌胞的存在, 并结合电镜观察得出菌胞已经成为了寄主体内特有的细胞器, 参与了酵母类共生菌在寄主褐飞虱世代间的传递过程。在我国大陆地区, 褐飞虱体内共生菌的研究起步较晚, 进入 20 世纪 90 年代才陆续开展, 且该领域的研究是结合抗性水稻防治褐飞虱危害的研究开展的。研究中发现酵母类共生菌在褐飞虱对水稻的致害性变异中可能起着重要作用, 如不同地理种群褐飞虱体内该类共生菌的数量存在显著差异(吕仲贤等, 2001a), 并与褐飞虱对水稻的致害性变异密切相关——即取食抗性品种水稻能显著减少虫体内酵母类共生菌的数量(吕仲贤等, 2000, 2001b, 2001c; Lü et al., 2004)。至今, 我国大陆地区仍未见有关褐飞虱体内酵母类共生菌的形态特征报道(陈法军等, 2005)。

本试验利用新近引入的国外冷冻切片机和显微摄像系统, 开展对褐飞虱体内酵母类共生菌的形态学研究, 以明确该类共生菌的个体形态特征以及在寄主虫体内的存在状态。

1 材料和方法

1.1 供试虫源

本研究所用褐飞虱雌成虫取自本实验室长期在感虫品种 TN1 水稻上连续继代饲养的实验种群。

*国家自然科学基金项目(30270199 和 30470227) 和浙江省博士后择优项目(2004-BSH-009) 资助。

通讯作者, yuxiaoping@sina.com

收稿日期: 2005-09-08, 修订日期: 2005-10-19.

1.2 仪器设备

1.2.1 冷冻切片系统

试验所用冷冻切片机为 Leica CM1900 冷冻切片机 (Leica Microsystems Nussloch GmbH, German)。切片厚度范围为 0~50 μm ，箱体最低控制温度为 -40 $^{\circ}\text{C}$ ，切片头最低控制温度为 -50 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.2 显微观察设备

虫体解剖观察采用 Leica S8 APO 连续变倍实体显微镜 (Leica Opti-tech Scientific Inc., German)。物镜配置为 0.63 \times 、1 \times 、2 \times ，目镜配置为 10 \times 和 25 \times ，变倍系数为 0~8.0。组织冷冻切片后的显微观察采用 Leica DMLS2 正置生物显微镜 (Leica Opti-tech Scientific Inc., German)。物镜配置为 5 \times 、10 \times 、20 \times 、40 \times 和 100 \times (油镜)，目镜配置为 10 \times 和 25 \times 。

1.2.3 显微摄像系统

摄像系统采用 Leica DFC320 数码摄像系统 (Leica Opti-tech Scientific Inc., German)，分辨率 3 300 000 像素。可与 Leica S8 APO 连续变倍实体显微镜和 Leica DMLS2 正置生物显微镜配套，利用 IPP 软件 (Image-Pro Plus version 4.0; Media Cybernetics, Inc. Georgia Avenue Silver Spring, MD, USA) 进行组织冷冻切片的显微摄像。

1.3 试验材料

样品包埋剂选用 Leica CM1900 冷冻切片机配套包埋剂 (OCT-compound)，组织染色选用常规染色剂——结晶紫，其它试剂和耗材还有二甲苯 (进行组织切片的脱水和透明处理)、香柏油 (油镜观察用)、载玻片 (若干)、吸水纸和擦镜纸等。

1.4 试验步骤

1.4.1 冷冻切片

从供试的褐飞虱实验种群中随机采集怀卵的雌成虫 (以腹部膨大为准) 300 头，置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。每次随机取 10 头成虫，解剖镜 (Leica S8 APO; Leica Opti-tech Scientific Inc., German) 下分别取头部、胸部和腹部进行冷冻切片。冷冻切片厚度为 5~7 μm ，冷冻切片机箱体温度设置为 -30 $^{\circ}\text{C}$ ，切片头温度设置为 -40 $^{\circ}\text{C}$ 。样品放于切片托 (直径 30 mm) 上，置于冷冻切片机样品架上预冷 30 min 后切片。组织切片自然粘贴于载玻片上，每张载玻片上放置 20~30 个样本切片用于显微观察。

1.4.2 结晶紫染色

每张粘贴有虫体组织切片的载玻片在酒精灯上加热固定 5 s，二甲苯脱水、透明处理 2~3 h，再次加热固定 5 s 后用结晶紫染色 3~5 min，自来水冲洗

10 min 后吸水纸吸水、风干。玻片风干后在显微镜下观察、拍照，以明确褐飞虱虫体内酵母类共生菌的形态特征和存在部位。

2 结果

2.1 酵母类共生菌在虫体内的存在部位

褐飞虱雌成虫的头部 (图 1 A) 和胸部 (图 1 B) 均未发现酵母类共生菌的存在，在其腹部的脂肪体中却观察到大量该类共生菌 (图 2 A~D)。此外，显微镜下还观察到大量菌胞存在于虫体腹部的脂肪体中 (图 3 A~D)。

2.2 酵母类共生菌的形态多样性

褐飞虱体内有多种形态的酵母类共生菌 (图 4)。其中，长梭形的个体最多 (图 4 A)，杆状类型其次 (图 4 B)，卵形酵母类共生菌较少 (图 4 C)，而球状个体更少见 (图 4 D)。此外，显微镜下还观察到一些不规则类型的共生菌，如具假膈梭状类型 (图 4 E) 和具假膈不规则个体 (图 4 F)。

2.3 酵母类共生菌的繁殖

褐飞虱体内酵母类共生菌以出芽进行无性繁殖 (图 5)。其中，顶端芽殖为主 (图 5 B、D~F)，还有两端芽殖 (图 5 C) 和侧面芽殖 (图 5 A) 等类型。

2.4 菌胞的发育

显微图片显示，伴随着寄主虫体的生长发育和繁殖，菌胞的发育可划分为 5 个阶段，即发育初期 (图 6 A)、共生菌增殖适应期 (图 6 B)、对数增长期 (高峰期; 图 6 C)、释放期 (图 6 D) 和衰竭期 (图 6 E)。

3 讨论

随着褐飞虱的生长发育，其体内的酵母类共生菌的数量不断增加 (Chen et al., 1981a; 吕仲贤等, 2001a; L Üet al., 2004)。其中，5 龄若虫期共生菌的数量激增，增幅占整个若虫期的 50% 以上；产卵前母体内共生菌的数量最多，产卵后母体内共生菌的数量则开始下降；而雄虫体内共生菌在 5 龄若虫期最多，5 龄若虫期和成虫期雌虫体内共生菌的数量均显著多于雄虫。另一方面，酵母类共生菌是通过褐飞虱雌成虫的卵巢传给下代卵的，这一过程称作卵巢侵染 (Ovary infection) (Houk & Griffiths, 1980)。Cheng & Hou (2001) 通过褐飞虱卵巢组织横切面的电镜观察证实了这一侵染过程，同时还发现交配后雌成虫的受精囊和获得的精包中并无共生菌的存在。由此推断，褐飞虱雄虫并没有参与世代间体内共生菌的传递过程。因此，本研究以褐飞虱雌

成虫作为供试虫源，既便于观察酵母类共生菌、减少工作量，又利于研究共生菌对褐飞虱种群发生的进化意义。

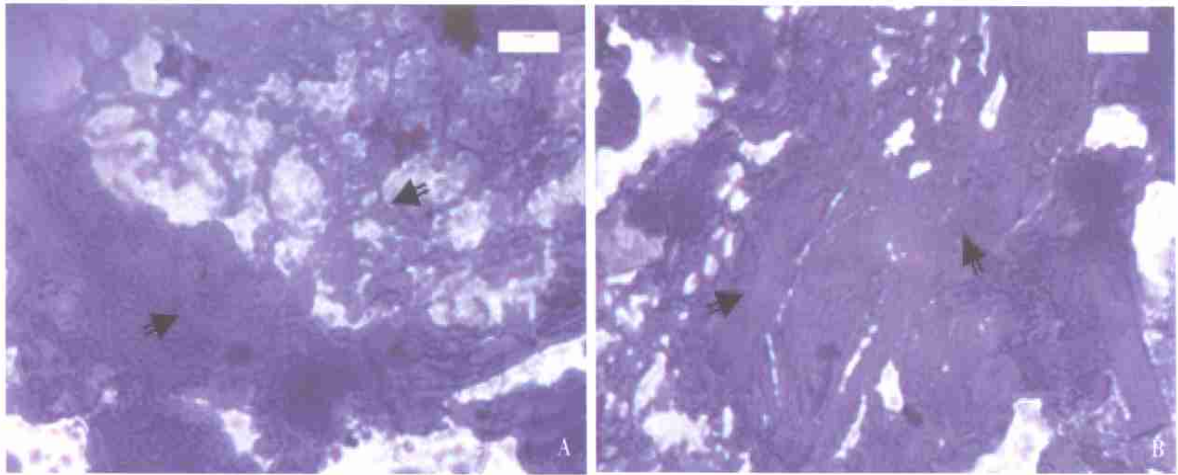


图 1 褐飞虱雌成虫头、胸部无酵母类共生菌的存在, 100 ×

Fig. 1. No yeast-like endosymbiote (YLES) excising in cephalosome and baenosome of female adults of brown planthopper (BPH), *Nilaparvata lugens*.

A. 头部 (cephalosome) B. 胸部 (baenosome) 比例尺 (scale bars) = 10 μm

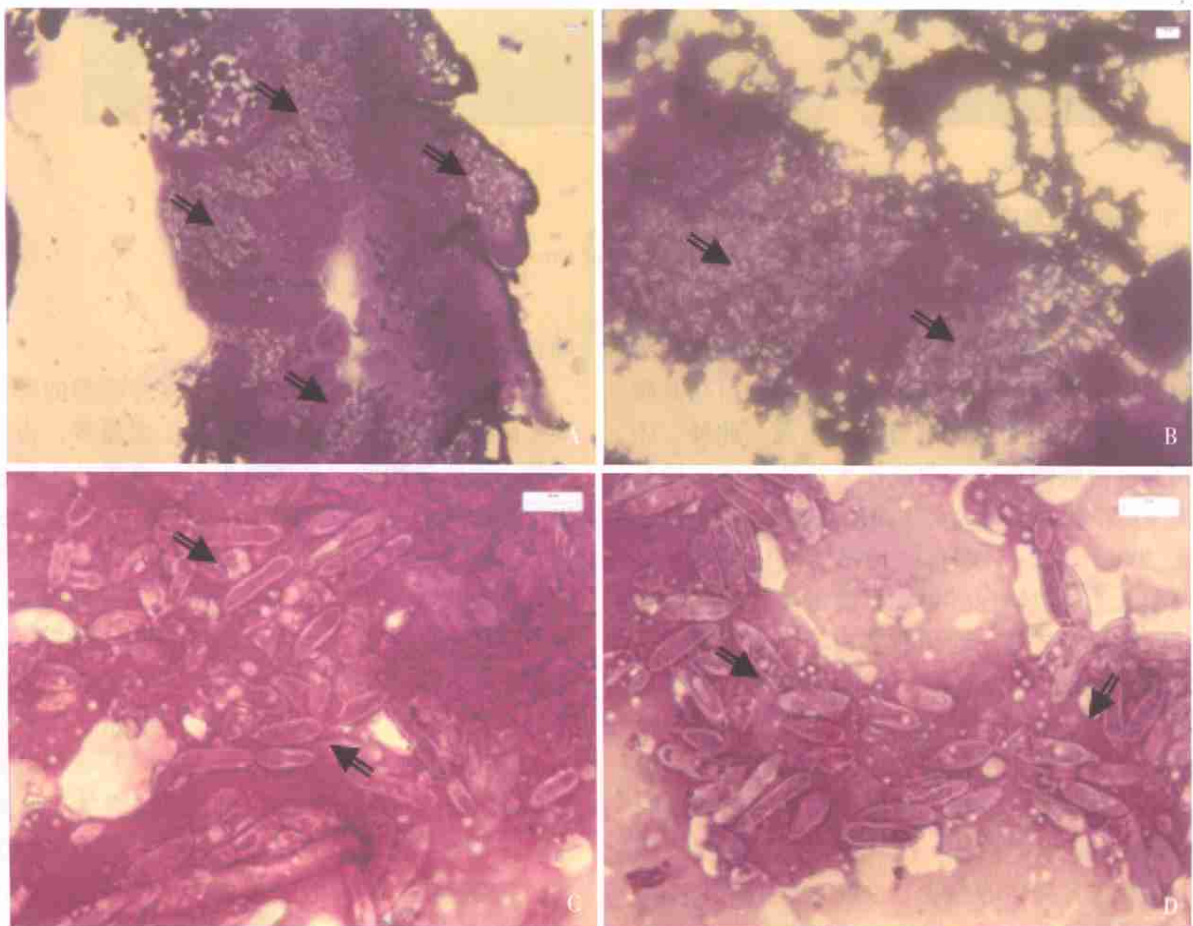


图 2 褐飞虱雌成虫腹部脂肪体内的酵母类共生菌

Fig. 2. YLES excising in abdomen fat body of female adults of BPH, *N. lugens*.

A. 20 × B. 40 × C, D. 100 × 比例尺 (scale bars) = 10 μm

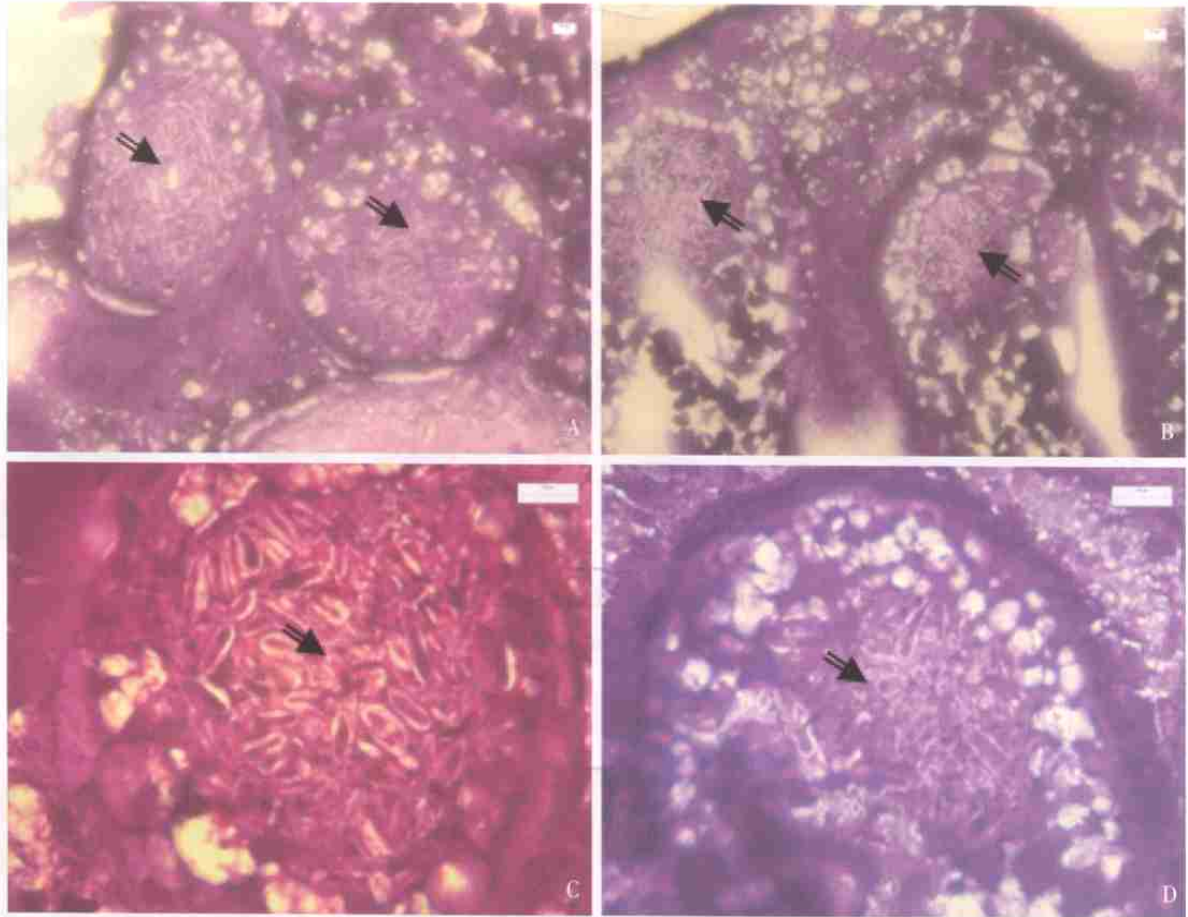


图3 褐飞虱雌成虫腹部脂肪体内的菌胞

Fig. 3. Mycetocytes of YLES excising in abdomen fat body of female adults of BPH.

A, B. 40 × C, D. 100 × 比例尺 (scale bars) = 10 μm

冷冻切片的显微观察证实, 褐飞虱雌成虫的头部和胸部均未发现酵母类共生菌的存在, 而在其腹部脂肪体内观察到大量的酵母类共生菌。此外, 还观察到大量菌胞的存在。菌胞作为特殊的细胞器参与了褐飞虱世代间酵母类共生菌的垂直卵传 (Cheng & Hou, 2001)。Cheng & Hou (1996, 2001) 结合光学显微镜和电子显微镜观察揭示了酵母类共生菌在褐飞虱体内的侵染过程, 即脂肪体内增殖、菌胞释放和合胞体胞外分泌 (Exocytosis)、卵巢侵染 (即细胞内吞作用; Endocytosis) 和卵内发育 4 个阶段。本研究观察到不同发育阶段的菌胞, 大致划分为发育初期, 共生菌增殖适应期、对数增长期 (高峰期)、释放期和衰竭期 5 个阶段。虽然冷冻切片的显微观察并没有发现合胞体的存在, 也没有观察到共生菌的胞外分泌现象以及卵巢侵染过程中共生菌的胞内吞现象, 本研究所观察到的菌胞发育过程 (即发生、发展和衰亡) 却正好与 Cheng & Hou (1996, 2001) 所揭示的酵母类共生菌在褐飞虱体内的侵染过程相

吻合。

本试验观察到褐飞虱体内有多种类型的酵母类共生菌。其中, 长梭形和杆状共生菌最多, 占绝大多数; 而卵形和球状个体很少见。该类共生菌通过出芽进行无性繁殖, 与前人的观察一致 (Chen et al., 1981a; Cheng & Hou, 1996)。同时, 试验中发现大多数共生菌以顶端芽殖 (包括两端同时出芽) 为主进行无性繁殖。此外, 观察中还发现具假隔膜梭形和不规则形共生菌, 经 IPP 软件测量得出其长和宽分别为 14.5 ~ 15.5 μm 和 4.5 ~ 5.5 μm, 7.5 ~ 8.5 μm 和 3.5 ~ 4.5 μm。按照 Chen et al. (1981) 和 Cheng et al. (1996) 给出的褐飞虱体内共生菌的个体形态和长、宽指标推断, 本研究中观察到的这两类具假隔膜共生菌也是酵母类共生菌。甘波谊等 (2000) 报道在褐飞虱体内有 *Wolbachia* 共生菌的存在。而褐飞虱体内是否还存在其他类型的共生菌 (如细菌、真菌等) 需要进一步的研究。

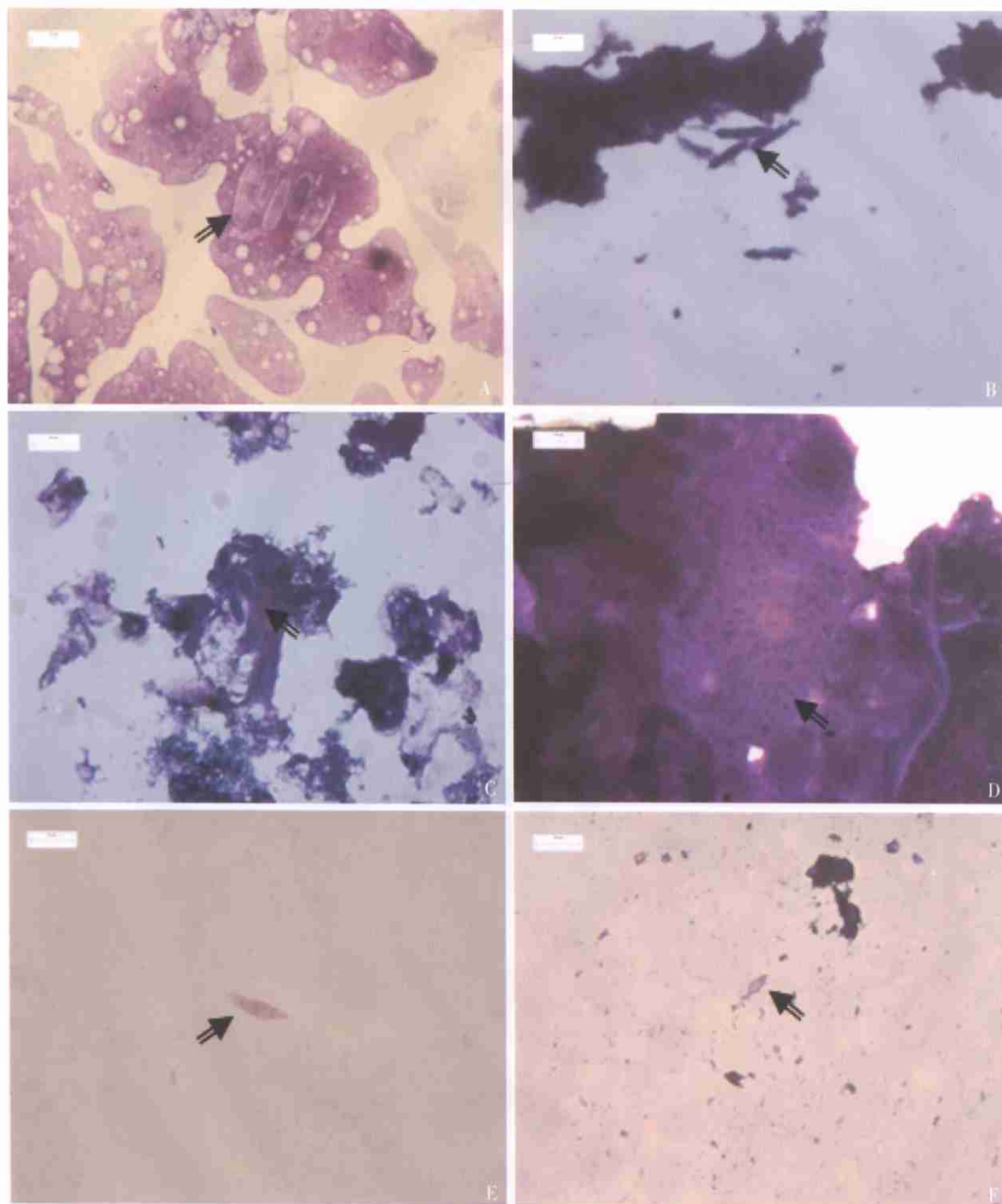


图 4 褐飞虱雌成虫腹部脂肪体内酵母类共生菌的形态多样性, 100 ×

Fig. 4. Morphological varieties of YLES excising in abdomen fat body of female adults of BPH.

A. 梭形 (fusiform) B. 杆状 (bacilliform) C. 卵形 (oval) D. 球状 (globose) E. 具假膈梭形 (fusiform with pseudo midribs) F. 具假膈不规则形 (abnormity with pseudo midribs) 比例尺 (scale bars) = 10 μm

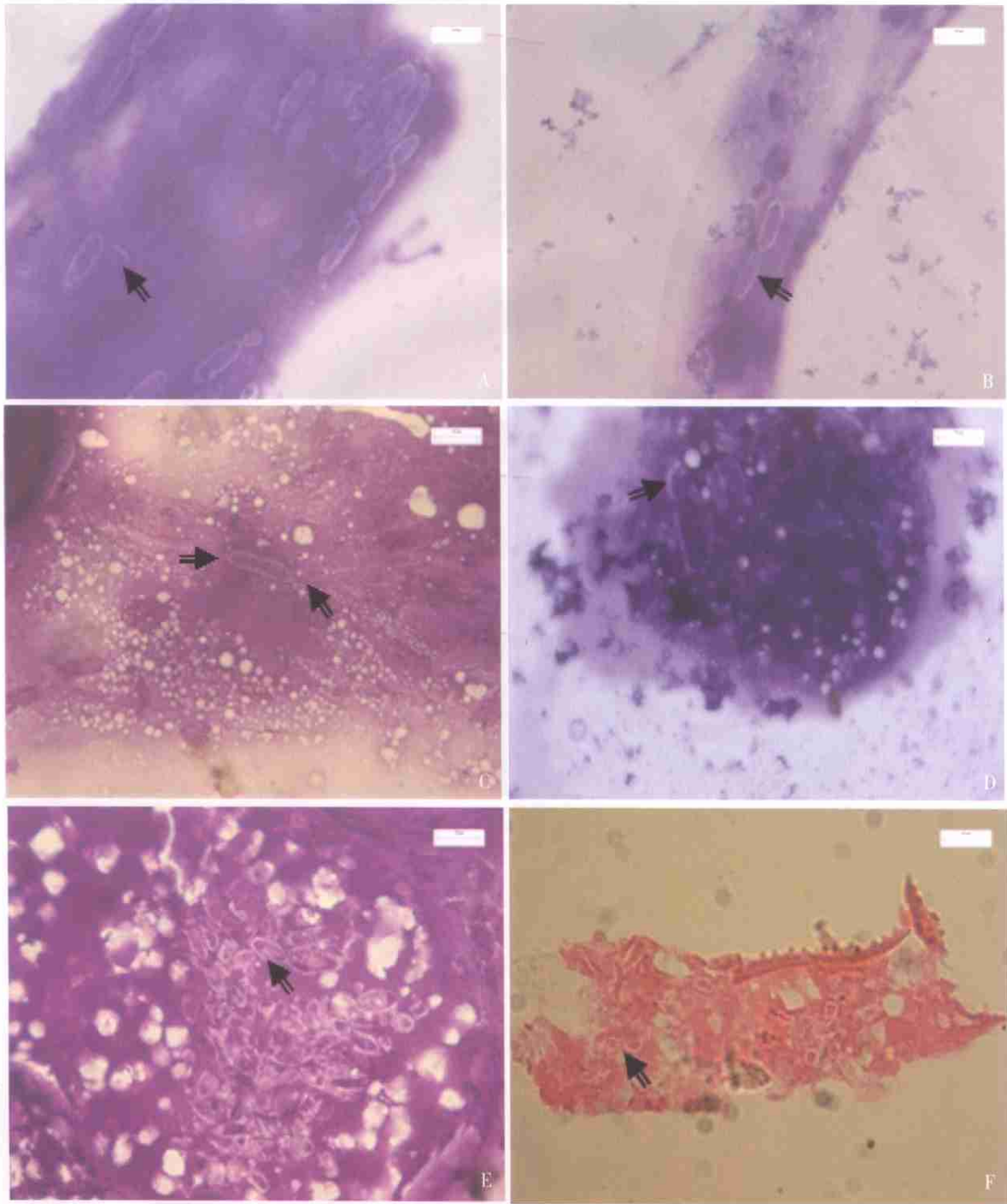


图5 褐飞虱雌成虫腹部脂肪体内酵母类共生菌的芽殖方式, 100 ×

Fig. 5. Proliferation manner of YLES excising in abdomen fat body of female adults of BPH.

A. 侧面芽殖 (lateral budding) B, D-F. 顶端芽殖 (budding on one cephalon); C. 两端芽殖 (budding on two cephalons simultaneously) 比例尺 (scale bars) = 10 μm

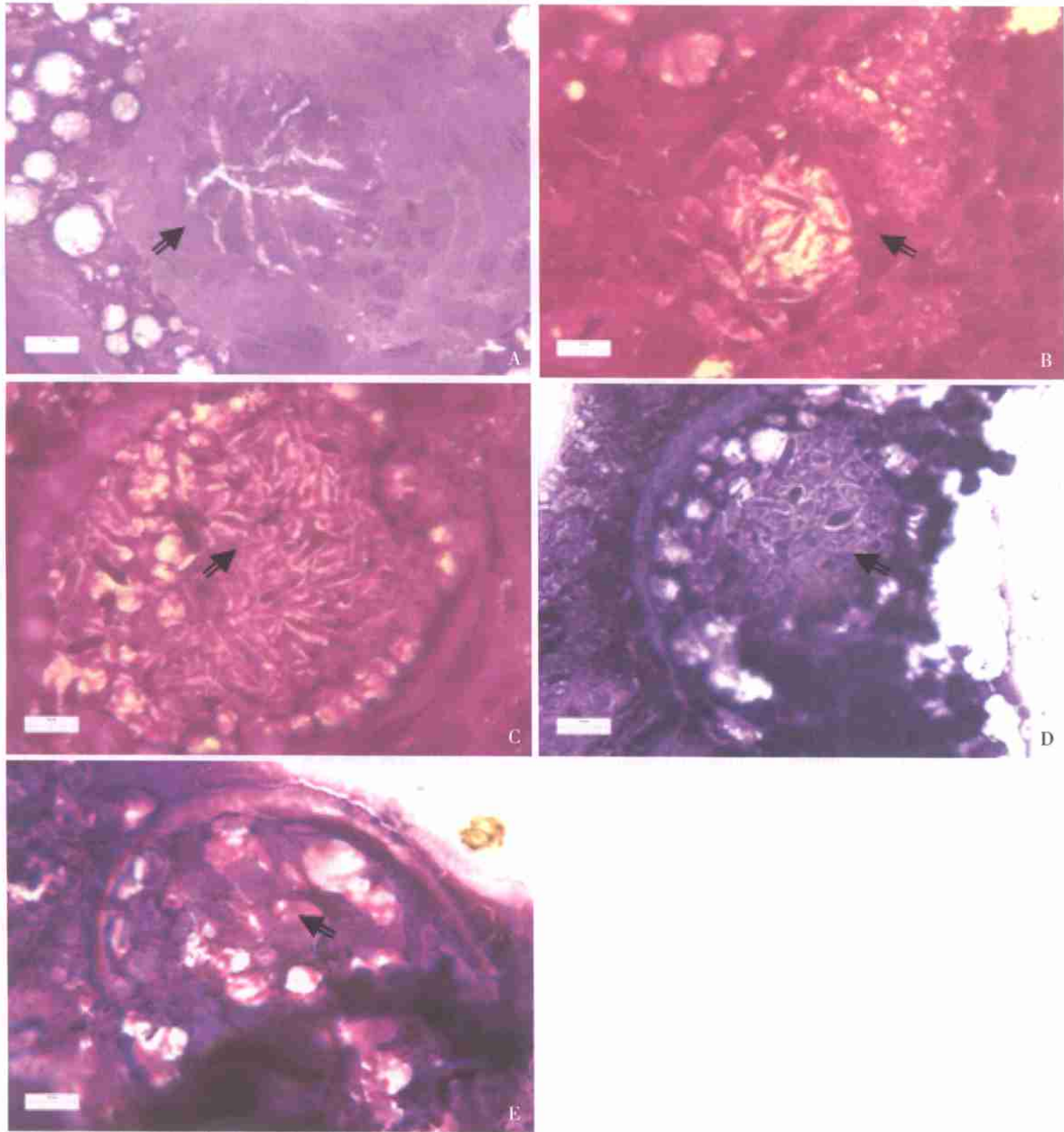


图 6 褐飞虱雌成虫腹部脂肪体内菌胞的发育, 100 ×

Fig. 6. Mycetocyte development of YLES excising in abdomen fat body of female adults of BPH.

A. 发育初期 (initial stage) B-E. 酵母类共生菌的繁殖适应期、对数增长期 (即高峰期)、释放期和衰竭期 (YLES adaptive reproducing, logistic increasing (i. e. fastigium), releasing and exhausting stages) 比例尺 (scale bars) = 10 μm

REFERENCES (参考文献)

- Chen, C-C, Cheng, L-L and Kuan, C-C 1981a. Studies on the intracellular yeast-like symbiote in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål). 1. Histological observation and population changes of the symbiote. *Z. Ang. Entomol.*, 91: 321-327.
- Chen, C-C, Cheng, L-L and Hou, R-F 1981b. Studies on the intracellular yeastlike symbiotes in brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål 2. Effects of antibiotics and elevated temperature on the symbiote. *Z. Ang. Ent.*, 92: 440-449.
- Chen, F-J, Zhang, J-F and Yu, X-P 2005. Progress in the histological studies of the intracellular yeast-like symbiote in rice planthoppers. *Entomological Knowledge*, 41 (6): 607-612. [陈法军, 张珏锋, 俞晓平, 2005. 稻飞虱酵母类胞内共生菌的组织学研究进展. *昆虫知识*, 41 (6): 607 ~ 612]
- Cheng, D-J and Hou, R-F 1996. Ultrastructure of the yeast-like endosymbiont in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homopteran: Delphacidae). *Endocytobiosis Cell Res.*, 11, 107-117.
- Cheng, D-J and Hou, R-F 2001. Histological observation on transovarial transmission of a yeast-like symbiote in *Nilaparvata lugens* (Stål)

- (Homoptera: Delphacidae). *Tissue & Cell*, 33 (3): 273-279.
- Gan, B-Y, Zhou, W-G, Zhao, X-Y, Feng, L-B and Li, C-B 2000. Infection and transmission of *Wolbachia* in Chinese planthopper species. *Journal of Fudan University (Natural Science)*, 39 (3): 331-337. [甘波谊, 周伟国, 赵新燕, 冯丽冰, 李昌本, 2000. *Wolbachia* 在中国稻田飞虱中的感染和传播. *复旦学报 (自然科学版)*, 39 (3): 331~337]
- Houk, E. J. and Griffiths, G. W. 1980. Intracellular symbiotes of Homoptera. *Annu. Rev. Entomol.*, 25, 161-187.
- Li, R-D, Ding, J-H and Hu, G-W 1996. Brown Planthopper and its Population Management. Fudan University Press, Shanghai. [李汝铎, 丁锦华, 胡国文, 1996. 褐飞虱及其种群管理. 上海: 复旦大学出版社]
- Li, Q, Luo, S-Y, Wei, S-M and Huang, F-K 1999. An analysis of the relationship of biotypes and seasonal migration of brown planthoppers in China. *Entomological Sinica*, 36 (5): 257-260. [李青, 罗善昱, 韦素美, 黄凤宽, 1999. 褐飞虱生物型测定及其与迁飞关系分析. *昆虫知识*, 36 (5): 257~260]
- L ü Z-X, Yu, X-P, Chen, J-M, Zheng, X-S and Xu, H-X 2000. The endosymbiotes in brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål, and its relationship with the resistant rice varieties. In: *China's Entomology Towards 21st Century*. China Science and Technology Publishing House. 969-973. [吕仲贤, 俞晓平, 陈建明, 郑许松, 徐红星, 2000. 褐飞虱体内共生菌种群及其与抗性水稻品种的关系. 走向 21 世纪的中国昆虫学. 北京: 中国科学技术出版社. 969~973]
- L ü Z-X, Yu, X-P, Chen, J-M, Zheng, X-S and Xu, H-X 2001a. The population dynamics of symbiote in body of brown planthopper from different geographic fields and adapted to different resistant rice varieties. *Entomological Journal of East China*, 10 (1), 44-49. [吕仲贤, 俞晓平, 陈建明, 郑许松, 徐红星, 2001a. 不同虫源和致害性的褐飞虱体内共生菌的种群动态. *华东昆虫学报*, 10 (1): 44~49]
- L ü Z-X, Yu, X-P, Chen, J-M, Zheng, X-S and Xu, H-X 2001b. The effect of endosymbiote on the development and reproduction of brown planthopper *Nilaparvata lugens* Stål. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 28 (3), 193-197. [吕仲贤, 俞晓平, 陈建明, 郑许松, 徐红星, 2001b. 共生菌对褐飞虱生长发育和繁殖的影响. *植物保护学报*, 28 (3): 193~197]
- L ü Z-X, Yu, X-P, Chen, J-M, Zheng, X-S, Xu, H-X and Tao, L-Y 2001c. Role of endosymbiote in virulence change of the brown planthopper to rice resistant varieties. *Acta Entomologica Sinica*, 44 (2), 197-204. [吕仲贤, 俞晓平, 陈建明, 郑许松, 徐红星, 陶林勇, 2001. 共生菌在褐飞虱致害性变化中的作用. *昆虫学报*, 44 (2): 197~204]
- L ü Z-X, Yu, X-P, Chen, J-M, Zheng, X-S, Xu, H-X, Zhang, J-F and Chen, L-Z 2004. Dynamics of yeast-like symbiote and its relationship with the virulence of brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål, to resistant rice varieties. *J. Asia-Pacific Entomol.*, 7 (3), 317-323.
- Nasu, S. 1963. Studies on some leafhoppers and planthoppers which transmit virus disease of rice plant in Japan. *Bull. Kyushu Agr. Expt. Stn.*, 8, 153-349. (in Japanese)
- Xiao, Y-F, Gu, Z-Y, Qiu, G, L ü B and Wang, Y-Q 1998. Track monitoring of the biotype of brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) immigrating into rice field in Jiang-huai region. *Acta Entomologica Sinica*, 41 (3), 275-279. [肖英方, 顾正远, 邱光, 吕班, 王跃群, 1998. 迁入江淮稻区褐飞虱生物型跟踪监测及分析. *昆虫学报*, 41 (3): 275~279]
- Yu, X-P 1990. Rearing the biotypes of *Sogatella furcifera* and *Nilaparvata lugens*. *Plant Protection*, 16 (4), 43-44. [俞晓平, 1990. 白背飞虱和褐飞虱生物型的饲养. *植物保护*, 16 (4): 43~44]
- Zhou, Y-H and Han, Z-J 2003. The brown planthopper biotypes: on the genetic mechanism of virulence. *Entomological Sinica*, 40 (3), 199-203. [周亦红, 韩召军, 2003. 褐飞虱生物型研究进展: 致害性变异的遗传机制. *昆虫知识*, 40 (3): 199~203]

MORPHOLOGICAL OBSERVATION ON THE YEAST-LIKE ENDOSYMBIOTES IN BROWN PLANTHOPPER, *NILAPARVATA LUGENS*

CHEN Fa-Jun^{1, 2}, ZHANG Jue-Feng¹, XIA Zhan-En¹, L ü Zhong-Xian¹, YU Xiao-Ping¹

1. Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Science, Hangzhou 310021, China

2. Agricultural and Biotechnological Colleges, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

Abstract Morphological characteristics of yeast-like endosymbiotes (YLES) in brown planthopper (BPH), *Nilaparvata lugens* Stål were studied by the cryostat microtome method in combination with the photomicrography. Light micrographs confirmed that there were no YLES in cephalosome and baenosome of BPH female adults. However, mass YLES were found existing in abdomen fat body of BPH female adults; simultaneously, a lot of mycetocytes were observed. Mycetocyte has become a special cell organ for its host (i. e. BPH), and its development is divided into five stages, viz, initial, YLES adaptive reproducing,

logistic increasing (i. e. fastigium), releasing and exhausting stages. Moreover, there were mainly four types of YLES in BPH female adults based on the morphological characteristics, viz., fusiform, bacilliform, oval and globose. Most YLES were fusiform and bacilliform individuals, only few were oval and globose ones, and some other types of symbiotes, i. e. fusiform and abnormality with pseudo midribs, were also found. The proliferation manner of YLES was asexually budding mainly on one cephalon, and on two cephalons simultaneously.

Key words *Nilaparvata lugens*, yeast-like endosymbiote, morphological characteristics, mycetocyte.