

球孢白僵菌不同菌株生物学特性及 对小菜蛾的毒力研究*

孙鹏飞, 陈斌**, 李正跃, 和淑琪

(云南农业大学 植物保护学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 室内测定了从鳞翅目小菜蛾、斜纹夜蛾和块茎蛾罹病虫体上分离纯化的球孢白僵菌菌株 DBM001, XWYE001 和 PTM001 的菌落生长速率、产孢量、孢子萌发速度, 及对小菜蛾幼虫的致病力, 并用时间-剂量-死亡率模型进行了分析。结果表明, 各菌株在菌落生长速率上无显著差异, 但各菌株的孢子萌发速率有显著差异。供试 DBM001, PTM001, XWYE001 三菌株对小菜蛾二龄幼虫的毒力测定结果表明: 供试 3 菌株对于小菜蛾均具有一定的毒力, 剂量效应参数分别为 0.424, 0.304, 0.297。在 10^8 孢子/mL, 10^7 孢子/mL, 10^6 孢子/mL, 10^5 孢子/mL, 10^4 孢子/mL 的孢子悬浮液下, 3 菌株孢子液处理后小菜蛾的累积死亡率分别为 94.0% ~ 48.0%, 76.0% ~ 28.0% 和 62.0% ~ 28.0%。3 菌株处理后第 3 d 时的 LC_{50} 分别为 6.5×10^7 孢子/mL; 4.07×10^7 孢子/mL 和 2.88×10^7 孢子/mL。在 10^6 孢子/mL 下, 3 菌株对小菜蛾幼虫的致死时间中时 LT_{50} 依次为 3.0, 4.1, 3.5 d。由此表明, 斜纹夜蛾和马铃薯块茎蛾菌株的对小菜蛾幼虫的致死时间效应较长, 均在 3 d 以上, 即球孢白僵菌不同菌株对小菜蛾种群增长的抑制作用时效差异较大, 尤其是斜纹夜蛾和马铃薯块茎蛾分离株对小菜蛾的毒力发挥较慢。

关键词: 球孢白僵菌; 生物学特性; 生物测定; 毒力; 小菜蛾

中图分类号: Q 935 文献标识码: A 文章编号: 1004-390X(2007)05-0635-04

Study on the Biological Characters of Isolates of *Beauveria bassiana* and their Virulence Against the *Plutella xylostella*

SUN Peng-fei, CHEN Bin, LI Zheng-yue, HE Shu-qi

(Faculty of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: The biological characters of three isolates of *Beauveria bassiana* was tested, isolates were marked as DBM001, XWYE001 and PTM001. More over, the virulence against the diamondback moth, *Plutella xylostella* was evaluated. Among the tested isolates, no significant difference was found in spore yield, germination rate, as well as the mycelium growth rates on SDAY medium. But the virulence against diamondback moth was similar. A time-dose-mortality model was used for analyzing the mortality as affected by both time and dosage. The results showed that all tested isolates were virulent to the larvae of diamondback moth, accumulative mortality was 94.0% ~ 48.0%, 76.0% ~ 28.0%, 62.0% ~ 28.0%. The value of LC_{50} for the these three isolate was 6.5×10^7 conidia/mL; 4.07×10^7 conidia/mL; 2.88×10^7 conidia/mL, on the 3rd day after inoculation, the LT_{50} for the 3 isolates ranged from 3.0, 3.5, 4.1 days under the inoculation of 10^6 conidia/mL.

Key words: *Beauveria bassiana*; biology characteristic; bioassay; virulence; *Plutella xylostella*

收稿日期: 2006-12-21

* 基金项目: 云南省科技重点攻关项目(2100NG57); 云南省科技厅项目(2003C0017Q); 云南省教育厅(02QY053)。

作者简介: 孙鹏飞(1981-), 山东人, 男, 硕士研究生, 主要从事昆虫病理学研究。

** 通讯作者

球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 属于半知菌亚门 (Deuteromycotina) 丝孢纲 (Hyphomycetes) 丛梗孢目 (Moniliales) 丛梗孢科 (Moniliaceae) 白僵菌属 (*Beauveria*)。白僵菌的寄生范围极广, 根据野外调查昆虫越冬发现, 因白僵菌致病而死的昆虫占真菌致病总数的 21%, 它可寄生 15 个目 149 个科的 700 多种昆虫及蛴螬类^[1~4]。目前对于球孢白僵菌的研究和应用比较广泛^[5~8]。然而, 可惜的是, 国内尚无球孢白僵菌产品上市, 主要原因之一就是菌种的退化及高毒力菌株的较少^[1~3]。由此分析比较不同来源菌株间生物性学特及死病性的差异, 对于高毒菌株的筛选具有重要意义, 同时也有利于我国杀虫微生物资源的合理利用和保护。小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 是一种世界性十字花科蔬菜害虫^[9~13], 研究表明一些球孢白僵菌株对小菜蛾具有很强的致病力^[14]。目前对小菜蛾病原菌对小菜蛾的毒力及防治已受关注。由此, 测定不同寄主来源的球孢白僵菌菌株对相同地理及生境下小菜蛾的毒力对于筛选对小菜蛾高毒菌株具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 供试菌株和培养基

供试菌株: 球孢白僵菌菌株 DBM001, PTM001 和 XWYE001, 分别分离自罹病的小菜蛾、马铃薯块茎蛾和斜纹夜蛾幼虫体上。供试菌株在 SDAY 培养基上培养 7 d 左右, 取孢子少许, 配制成浓度为 10^{10} 孢子/ml 的孢子悬浮液。

1.2 菌株生物学特性测定

在 SDAY 培养基上培养 10 d 的菌落, 用直径为 13 mm 的打孔器在距离培养皿中心相同的位置取菌块, 配制孢子悬浮液, 用血球计数板测定产孢量。各菌株分别培养 10 d 后, 取新鲜孢子于孢子萌发液 (2% 蔗糖 + 0.5 蛋白胨), 在 25 °C 下, 培养 24 h 后, 测定其孢子萌发率。

1.3 液体培养菌丝生长特性

连续培养 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h 后, 在显微镜下测量取菌丝长度。并取混合物进行过滤, 离心, 将过滤物在 60 °C 下烘干至恒重, 称取出菌丝干重, 计算出单位容积的菌丝生物量。

1.4 对小菜蛾幼虫的致病性测定

小菜蛾从甘蓝地甘蓝上采集到室内, 连续饲养几代后得到龄期一致的 2 龄幼虫供试。

用各菌株的分生孢子粉制成分布均匀的 10^8 孢子/mL 的孢子悬浮液并稀释成 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 孢子/mL 5 种浓度梯度, 将新鲜甘蓝叶打成直径 90 mm 的圆片后, 浸入各孢子悬浮液中 10 s, 置入培养皿内, 然后移入 2~3 龄初幼虫, 每孢子含量梯度重复 3 次, 每个浓度梯度测定 30 头 2~3 龄初幼虫。48 h 后换入新鲜甘蓝叶, 在 25 °C 下培养观察 10 d, 记录每天的死亡虫数。

1.5 数据处理与分析

各处理的孢子萌发率利用方差分析和 Duncan 氏新复极差法进行显著性差异比较, 生物测定数据采用“时间 - 剂量 - 死亡率”模型进行模拟分析并计算相关参数的估计值。所有分析和运算均用 DPS 软件完成^[15]。

2 结果与分析

2.1 不同菌株生物学特性

2.1.1 菌落生长速率和产孢量

从小菜蛾、斜纹夜蛾和块茎蛾分离的 3 株球孢白僵菌菌株, 在 SDAY 培养基上于 25 °C 下连续培养 7 d 后, 各菌株菌落的生长趋势基本一致, 尤其是在培养的前 3 d, 从培养第 4 d 开始, 菌落直径增长较快。其中从斜纹夜蛾罹病虫体上的分离株生长最快, 第 7 d 观察其菌落直径达到 37.9 mm, 与其他分离株的菌落直径间无明显差异。从培养第 2 d 开始, 直到第 7 d, 3 菌株的直径增长率均呈现前 3 d 增长速度快于培养 3 d 后, 菌株 DBM001 菌落直径增长率为 70.89%, 38.90%, 24.01%, 26.85%, 1.00% 和 3.24%; 菌株 XWYE001 菌落直径增长率为 63.14%, 31.58%, 31.58%, 20.33%, 0.67% 和 4.78%; 菌株 PTM001 菌落直径增长率分别为 47.46%, 36.32%, 24.80%, 14.83%, 7.37% 和 3.88%。

连续培养后, 各菌株在 SDAY 培养基上产孢量不同, 培养第 3 d, 3 菌株的产孢量分别为 $(2.32 \pm 0.13) \times 10^6$, $(2.68 \pm 0.43) \times 10^7$ 和 $(2.19 \pm 0.29) \times 10^6$ 孢子/mL, 即斜纹夜蛾分离株产孢量高于其它两个菌株 ($F = 4.56, P = 0.045$)。培养至第 4 d 时开始, 各菌株产孢量无显著差异。由此表明, 3 菌株在 SDAY 培养基上产孢量间无明显差异。

2.1.2 孢子萌发率

结果表明, 各菌株分生孢子萌发率间无显著差异, 培养第 4 d, 各菌株的孢子萌发率均达 100%

(表1)。小菜蛾分离株孢子萌发率在24 h,48 h,72 h和96 h的孢子萌发率分别为(50.7 ± 13.6)%, (73.65 ± 21.5)%, (86.87 ± 17.25)%和100%;斜纹夜蛾分离株的孢子萌发率(52.6 ± 15.6)%, (79.9 ± 16.7)%, (91.4 ± 16.5)%和100%;马铃薯

薯块茎蛾体上分离株孢子萌发率在培养24 h的孢子萌发率为(46.9 ± 1.15)%,48 h的孢子萌发率为(62.1 ± 2.61)%;72 h的萌发率为(95.86 ± 0.55)%,96 h萌发率达100%。

表1 分生孢子萌发率

Tab.1 Germination of conidia of isolates of *Beauveria bassiana*

菌株 isolates	孢子萌发率/% conidia germination			
	24 h	48 h	72 h	96 h
DBM001	50.7 ± 13.6	73.65 ± 21.5	86.87 ± 17.25	100
XWYE001	52.6 ± 15.6	79.9 ± 16.73	91.47 ± 16.5	100
PTM001	46.9 ± 1.15	62.10 ± 2.61	95.86 ± 0.55	100

2.1.3 液体培养生长速率

(1) 培养液生长速度测定

供试3个菌株液体培养液深度随培养时间的

延长,培养液浓度的OD值增加(表2),但从培养第1 d开始,斜纹夜蛾菌株浓度的OD值始终高于其他2个菌株。但3菌株间差异不显著(表2)。

表2 不同培养时间液体培养液浓度测定

Tab.2 The concentration of culture during the culturing

菌株 isolates	OD值				
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
DBM001	0.033 ± 0.034	0.323 ± 0.008	0.33 ± 0.014	0.163 ± 0.010	0.167 ± 0.11
XWYE001	0.163 ± 0.011	0.22 ± 0.002	0.34 ± 0.017	0.487 ± 0.021	0.597 ± 0.043
XW7001	0.15 ± 0.001	0.217 ± 0.013	0.193 ± 0.004	0.456 ± 0.020	0.51 ± 0.0989
	<i>F</i> = 0.54, <i>P</i> = 0.35	<i>F</i> = 0.46, <i>P</i> = 0.67	<i>F</i> = 0.59, <i>P</i> = 0.75	<i>F</i> = 0.65, <i>P</i> = 0.58	<i>F</i> = 0.79, <i>P</i> = 0.67

(2) 菌丝生长量测定

3菌株在液体培养基上生长较慢,尤其是在培养的前3 d菌丝干重很低,直到培养的第4 d,3菌株菌丝干重间差异不显著(*F* = 0.69, *P* = 0.58),连续培养至第7 d,3分离株菌丝生长量干重为(0.0333 ± 0.0058)g, (0.0397 ± 0.0058)g和(0.0417 ± 0.0115)g,三者间无明显差异(*F* = 0.167, *P* = 0.85)。

由此表明,来源不同的3菌株中斜纹夜蛾菌株培养后吸光值及菌丝生长量略高于其他两个菌株,但差异不显著。

2.2 球孢白僵菌菌株对小菜蛾的毒力

配制的孢子悬浮液对孢子无毒副作用,镜检后孢子萌发率均在95%以上。

结果表明:供试DBM001,PTM001 XWYE001菌株对于小菜蛾均具有一定的毒力,剂量效应参数分别为0.424,0.304,0.297。从图1看出,各菌株对小菜蛾有不同程度的致病能力。在10⁸ ~ 10⁴孢

子/mL下处理后第2 d就出现死亡,在10⁴孢子/mL下处理后死亡较慢。于高剂量下(10⁷ ~ 10⁶孢子/mL)处理后,来自小菜蛾分离菌株对小菜蛾的累积死亡率可达到94%。在观察时限内,累积死亡率随着处理后时间的延长而递增。DBM001在10⁸孢子/mL,10⁷孢子/mL,10⁶孢子/mL,10⁵孢子/mL,10⁴孢子的孢子悬浮液下,小菜蛾的累积死亡率分别为94.0%,80.0%,72.0%,66.0%和48.0%;XWYE001菌株对小菜蛾的感染累积死亡率分别为76.0%,66.0%,58.0%,42.0%和28.0%;而来源于罹病马铃薯块茎蛾的PTM001菌株对小菜蛾的累积死亡率分别为62.0%,52.0%,40.0%,36.0%和28.0%。

从处理后LT₅₀来看,小菜蛾、斜纹夜蛾和马铃薯块茎蛾菌株的对小菜蛾幼虫的致死中时间为,在10⁶孢子/mL下,LT₅₀依次为3.0,4.1,3.5 d。由此表明,斜纹夜蛾和马铃薯块茎蛾菌株的对小菜蛾幼虫的致死时间效应较长,均在3 d以上,即球

孢白僵菌不同菌株对小菜蛾种群增长的抑制作用时效差异较大,尤其是斜纹夜蛾和马铃薯块茎蛾分离株对小菜蛾的毒力发挥较慢。

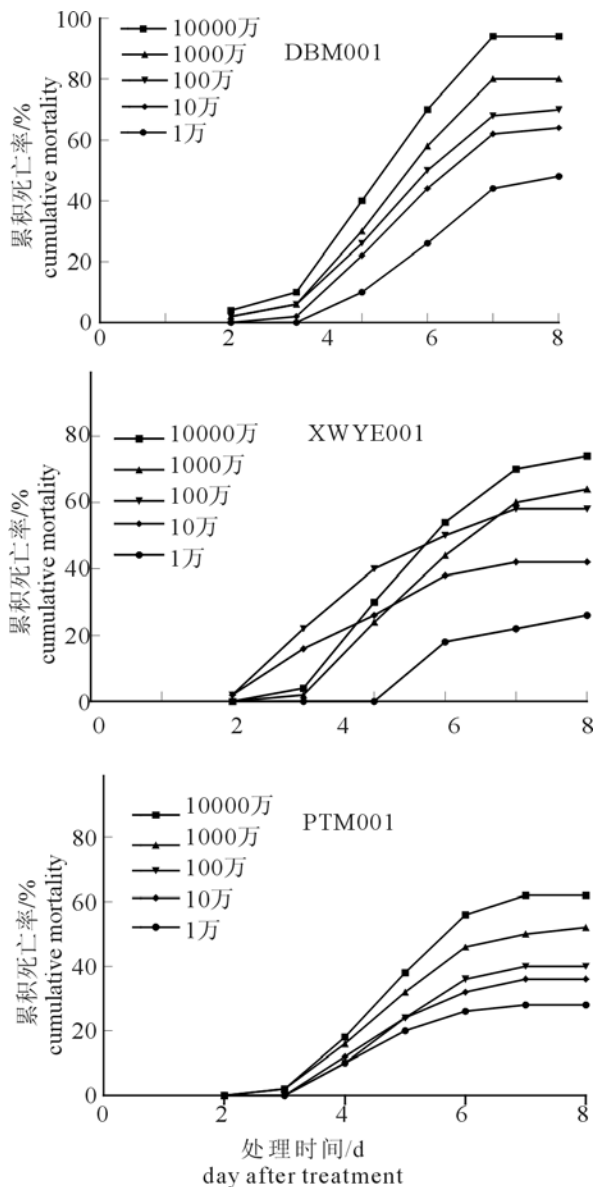


图 1 小菜感染球孢白僵菌不同菌株后的累积死亡率
Fig. 1 Cumulative mortality of Diamondback moth after inoculation of isolates of *B. bassiana*

3 讨论

(1) 本研究中,从鳞翅目昆虫上分离的球孢白僵菌株的菌落生长速率和产孢量均较低,而据何余容等(2004)报道,分离自鞘翅目昆虫成虫的分离株菌落属于生长比较迅速的类型,直径平均每天增长 2 mm 以上,某些分离株培养第 10 d 时菌落直径达到 35.67 mm^[16]。因此,不同目寄主昆虫分离的

球孢白僵菌菌株间生长速率的差异情形及引起差异的原因,有必要进行深入研究。

(2) 从采集地理位置来论,供试 3 菌株中前二菌株均采自云南昆明,马铃薯块茎蛾菌株采自云南甸甸,地理区划上均属于云南中部地区,其培养生物学特征间却无明显差异,该结果虽与文献报道相同,即来源于相同或相邻地区的菌株具有更大的遗传或表型相似性^[17-19]。但据王成树等^[20]报道,相同目寄主分离菌株多样性指数高于相同地理来源的菌株平均多样性,即相同目寄主分离菌株间的差异性大于相同地理来源菌株间的差异性。因此,对于该 3 菌株间的相似性或相异性还有必要采用分子生物学方法进行研究。

(3) 小菜蛾、斜纹夜蛾和马铃薯块茎蛾隶属于鳞翅目害虫,球孢白僵菌虽为一种寄主、分布广泛的杀虫真菌,但从本研究结果来看,分离自第一寄主昆虫的菌株对原始第一寄主昆虫的毒力略高于对其他寄主昆虫的毒力,对于此原因还有待于通过生理生化研究来剖析。

[参考文献]

- [1] FENG M G, POPRAWski T J, KHACHATOURIANS G G. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status [J]. *Biocontrol Science and Technology*, 1994, (4): 3-34.
- [2] LACEY L A, FRUTOS R, KAYA H A, et al. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do they have a future? [J] *Biol. Control*, 2001, 21: 230-248.
- [3] LACEY L A, GOETTEL M S. Current developments in microbial control of pests and prospects for the early 21st century [J]. *Entomophaga*, 1995, 40(1): 3-27.
- [4] 蒲蛰龙,李增智. 昆虫真菌学 [M]. 合肥:安徽科学技术出版社,1996.
- [5] 李光西,张永军,方卫国,等. 球孢白僵菌制剂防治香料烟蚜虫的试验 [J]. *云南农业大学学报*, 2002, 17(3): 243-244.
- [6] 陈斌,冯明光. 两种杀虫真菌制剂与低用量吡虫啉对温室粉虱的协同防效评价 [J]. *应用生态学报*, 2003, 14(11): 1934-1938.
- [7] FENG M G, CHEN B, YING S H. Trials of *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* and imidacloprid for management of *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) on greenhouse grown lettuce [J]. *Biocontr. Sci. Technol*, 2004, 14(6): 41-44.

(下转第 644 页)

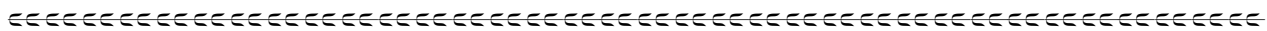
其应该加强高风险区和较高风险区的松木制品和松木包装的检疫。在加强松材线虫检疫的同时,还应该继续进行松材线虫萎蔫病的普查监测,做到早发现早治理以确保森林安全。

(3)有害生物风险评估是一个动态过程,需要根据实际情况不断更新。随着气候变化、贸易发展、人为活动等因素的不断变化,有害生物传入的风险以及其可能造成的潜在危害也在不断的变化,在实际工作中应不断的更新数据,根据具体情况解除已经不存在的风险或增加新出现的风险。在以往工作基础上,本文修订了松墨天牛分布区域^[9]、寄主分布等数据,对风险评估结果进行了修正。

[参考文献]

[1] 杨宝君,潘宏阳,汤坚,等. 松材线虫病[M]. 北京:中国林业出版社,2003.
 [2] MAMIYA Y. History of pine wilt disease in Japan[J]. Journal of Nematology, 1988, 20(2): 219 - 226.

[3] 徐汝梅. 生物入侵数据集成、数量分析与预警[M]. 北京:科学出版社,2003.
 [4] 王峰,李丹蕾,喻盛甫. 松材线虫风险评估数据库[J]. 莱阳农学院学报,2004, 21(2): 162 - 163.
 [5] FAO. International Standards for Phytosanitary Measures—Pest Risk Analysis for Quarantine Pests Including Analysis of Environmental Risks and Living Modified Organisms (No. 11) [Z]. Rome: ISPM, 2004: 1 - 20.
 [6] MACLEOD A, BAKER R H A. The EPPO pest risk assessment scheme: assigning descriptions to scores for the questions on entry and establishment [Z]. OEPP/EPPO Bulletin, 2003, 33: 313 - 320.
 [7] OEPP/EPPO. EPPO Standard PM 5/3 Guidelines on pest risk analysis pest risk assessment scheme [Z]. OEPP/EPPO Bulletin, 1997, 27: 281 - 305.
 [8] 胡赛蓉,赵宇翔,李北屏,等. 松材线虫病疫木安全利用新途径[J]. 中国森林病虫,2006,(5):26 - 28.
 [9] 赵宇翔,徐正会,喻盛甫,等. 拟松材线虫媒介昆虫报道[J]. 西南林学院学报,2006,26(3):47 - 51.



(上接第 638 页)

[8] 濮小英,冯明光. 两种杀虫真菌制剂对茶小绿叶蝉的田间防效评价[J]. 应用生态学报,2004,16(4): 619 - 622.
 [9] TALEKAR N S, SHELTON A M. Biology, ecology and management of diamondback moth[J]. Annual Review of Entomology, 1993, 38: 275 - 301.
 [10] TABASHNIK B E, CUSHING N L, JOHNSON M W. Diamondback moth resistance to insecticides in Hawaii: intra-island variation and cross-resistance[J]. Journal of Economic Entomology, 1987, 80: 1091 - 1099.
 [11] 闫艳春,乔传令,钱传范. 小菜蛾抗药性研究进展[J]. 昆虫知识, 1997, 34(5): 310 - 314.
 [12] 赵怀玲,尤民生. 小菜蛾抗药性及其治理对策的研究进展[J]. 华东昆虫学报,2001, 10(1): 82 - 88.
 [13] 吴敏,韩召军,孟建业,等. 南京地区小菜蛾的抗药性检测及初步分析[J]. 昆虫学报, 2005, 48(4): 633 - 636.
 [14] SELMAN B J, DAYEY S, HASAN M. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Bab.) Vuill. to the larvae of Diamondbackmoth, *Plutella xylostella* [J]. J Appl Entomol, 1997, 21(1): 47 - 49.

[15] 唐启义,冯明光. 实用计算机统计分析及其计算机处理平台[M]. 北京:中国农业出版社,1997.
 [16] 何余容,吕利华,邝灼彬,等. 球孢白僵菌不同分离株的生物学及对小猿叶甲成虫致病性测定[J]. 昆虫知识,2004,41(5):442.
 [17] 王成树,黄勃,樊美珍,等. 球孢白僵菌对马尾松毛虫的毒力与孢子萌发行为的关系[J]. 森林病虫通讯,1998,17(3):12 - 14.
 [18] 王成树,高松,李增智,等. 球孢白僵菌营养亲和型多样性与生态背景的关系[J]. 菌物系统,2000,19(2):230 - 235.
 [19] ST LEGER R J, ALICEL L L, MAY B, et al. . Worldwide distribution of genetic variation among isolates of *Beauveria* spp. [J]. Mycological Research, 1992, 96: 1007 - 1015.
 [20] 王成树,黄勃,王四宝,等. 球孢白僵菌培养特征多样性与寄生及地理来源的相关性分析[J]. 生物多样性,2002,10(2):196 - 201.