

## 莱氏野村菌云南菌株的宿存时间特征研究\*

陈鸣霞, 陈斌\*\*, 李正跃, 孙飞跃  
(云南农业大学植物保护学院, 云南昆明 650201)

**摘要:** 室内测定了莱氏野村菌云南菌株 NE050913 和 NE050909 在土壤中及在不同温度下的宿存时间特征。结果表明, 莱氏野村菌接种于土壤后随时间的延续, 活孢率逐渐降低, 在土壤中宿存 3 个月以上活孢率迅速降低, 接种 119 d 时孢子全部失活。每 g 土壤中两菌株 CFU 的对数与处理后的天数  $x$  成线性相关关系, 其中菌株 NE050913 的时间 - CFU 对数的关系式为  $\lg y = 7.7029 - 0.1932x$ , ( $R = 0.89$ ), 半衰期为 41.4 d; 菌株 NE050909 的时间 - CFU 对数的关系式为  $\lg y = 6.8531 - 0.1475x$  ( $R = 0.854$ ), 半衰期为 49.5 d, 即菌株 NE050909 分生孢子失活快于菌株 NE050913。在 4℃ 和 22℃ 条件下存贮菌株 NE050913 的分生孢子, 随着存贮时间的延续, 孢子活性渐降低, 22℃ 条件下孢子活性的下降明显快于在 4℃ 条件下存贮的孢子, 22℃ 存贮的孢子的萌发率在 86 d 时已经失去萌发能力, 而 4℃ 存贮的孢子仍有 16.3% 的萌发率。由此表明, 在 22℃ 条件下不利于莱氏野村菌分生孢子的存贮, 4℃ 条件下可作为临时存贮。

**关键词:** 莱氏野村菌; 萌发率; 宿存; 成菌落数

**中图分类号:** Q 935    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1004 - 390X(2007)05 - 0753 - 03

## Study on the Survival Stage of the Isolates of *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson in Yunnan

CHEN Ming-xia, CHEN Bin, LI Zheng-yue, SUN Fei-yue  
(Faculty of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

**Abstract:** The survival time of the conidia of two isolates of *Nomuraea rileyi* (Farlow) from Yunnan in soil and under the different temperatures was studied in terms of the culturing characteristics of germination of conidia. Results showed that The CFU (Colony Forming Unit) of the isolate of *N. rileyi* that survived in soil decreased with the time after inoculation and that decreased quickly in the soil, the half life of the conidia of the tested isolates in soil was 41.4 d and 49.5 d, respectively. The viability of the conidia decreased quickly under the temperature of 4℃ and 22℃, the conidia germination rate decreased with the storage time, it was 16.3% after the stored for 86days in 4℃, but and no germination was tested after stored in 22℃.

**Key words:** *Nomuraea rileyi*(Farlow)Samson; germination rate; survival; CFU(colony forming unit)

莱氏野村菌 [*Nomuraea rileyi*(Farlow) Samson] 是一种世界性分布的虫生真菌, 能寄生夜蛾科等 40 多种昆虫, 尤其是在夜蛾科害虫种群中的发生流行对其种群的自然控制起着重要作用<sup>[1~3]</sup>, 有关莱氏野村菌发生流行特点、生物学特性及应用研究

方面都已有不少报道<sup>[4~11]</sup>。虫生真菌宿存生物学特性的研究是虫生真菌系统开发研究中的重要内容之一, 已成为害虫微生物制剂研究中的重要内容。目前, 对于白僵菌及绿僵菌等发生流行普遍的虫生真菌菌株的宿存生物学特性研究均已报道,

收稿日期: 2006 - 12 - 25

\* 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); 云南省教育厅资助项目(02QY053)。

作者简介: 陈鸣霞(1981 -), 女, 云南昆明人, 硕士研究生, 主要从事昆虫病理学研究。

\*\* 通讯作者

而对其发生流行普遍的野村菌的突存动态情况尚无系统研究报道<sup>[12~15]</sup>。因此,对不同菌株宿存时间特征的研究将为系统研究和利用提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试菌株

供试莱氏野村菌菌株 NE050913 和 NE050909 分别采自蒙自中地卷心菜和呈贡西兰花罹病夜蛾体。

### 1.2 分生孢子在土壤中的宿存时间

#### 1.2.1 成菌落数测定

在未灭菌的土壤中接种莱氏野村菌分生孢子粉( $1.6 \times 10^7$  孢子/g),接种量为 100 g 土样加入 0.3 g 分生孢子粉,混匀后装入 12 cm 培养皿中,随即埋入土中。盛土皿的上表面与土表平。取样 5 g,充分混匀后,准确称取 0.5 g,装入容量为 10 mL 的离心管,每管加入 0.05% 的吐温-80 灭菌水 5 mL,3 000 r/min 离心 10 min,在孢子层中吸取 1 mL,稀释成  $1.0 \times 10^{-4}$  浓度,取稀释液 0.1 mL,铺于选择性培养基表面(培养基成分为 1 000 mL SDAY 中,链霉素 500 mg), $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$  恒温培养 10 d,检查菌土中的成菌落数(CFU)。每次在分生孢子接种的培养皿中取样,每个处理重复 3 次,每 7 d 取样一次,测定成菌落数。

#### 1.2.2 不同温度条件贮存下的孢子萌发率

本试验共设  $4^\circ\text{C}$  冰箱保存和  $22^\circ\text{C}$  温箱保存 2 个处理,每个处理设置 50 瓶重复,用封口蜡将小瓶封口。每 7 d 对小瓶中的菌粉进行孢子萌发的检查 1 次,取少许保存于小瓶中的孢子粉配制成浓度

为  $2.0 \times 10^7$  孢子/mL 的悬液,按 5% 的比例接入盛有 40 mL 萨氏培养液(SDAY 中去掉琼脂)的 150 mL 锥形瓶中,使培养液中孢子浓度为  $1.0 \times 10^6$  孢子/mL, $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$  振荡(120 r/min)培养 48 h 后用血球计数器计数液样中发芽和未发芽的孢子数,重复取样测定 3 次,计算平均萌发率,即为活孢率。

## 2 结果与分析

### 2.1 分生孢子在土壤中的宿存

由表 1 看出,莱氏野村菌 NE050913, NE050909 菌株分别接种在土壤中分生孢子随接种后时间的延续,分生孢子的萌发率逐渐降低,菌株 NE050913 接种后第 51 d 时活孢数降低达 30% 以上,而菌株 NE050909 则在接种后第 65 d 时活孢数降低达 30% 以上,即后者活孢率降低稍慢于前者菌株。两菌株在接种后第 93 d 和 108 d 时活孢率迅速降低,活孢率降低达 80% 以上,到第 119 d 时则全部失去活性。因此,该菌种在土壤中存活时间在 3 个月以内具有较强的活性,而保存时间达 3 个月以上时则孢子活性降低。

经对每 g 土壤中 CFU 的对数与处理后的天数  $x$  成线性相关关系进行模拟,结果表明,菌株 NE050913 CFU 的对数与处理后的天数  $x$  的线性相关关系式为  $\lg y = 7.7029 - 0.1932x (R = 0.89)$ ,半衰期为 41.4 d;  $\lg y = 6.8531 - 0.1475x (R = 0.854)$ ,半衰期为 49.5 d。即菌株 NE050909 活孢率减退稍慢于菌株 NE050913。

表 1 莱氏野村菌分生孢子在土壤中的宿存动态

Tab. 1 The persistence of isolates of NE050913 and NE050909 in soil at different period in terms of CFU per g soil

宿存时间/d Persistence period	菌株 NE050913 Isolate NE050913		菌株 NE050909 Isolate NE050913	
	成菌落数 CFU	CFU 降低率/%	成菌落数 CFU	CFU 降低率/%
4	163.42 ± 15.28	-	105.33 ± 10.87	-
12	159.67 ± 36.67	2.11	103.66 ± 14.30	1.59
23	134.21 ± 75.80	16.12	98.66 ± 12.14	4.82
30	99.88 ± 87.32	25.52	90.16 ± 35.58	8.62
37	86.22 ± 50.57	13.68	80.50 ± 10.86	10.71
51	59.22 ± 38.53	31.32	72.00 ± 13.13	10.56
65	38.33 ± 35.66	35.28	47.56 ± 11.89	33.94
79	22.88 ± 20.05	40.31	27.67 ± 11.76	41.82
93	12.22 ± 11.38	46.59	14.43 ± 9.23	47.85
108	1.33 ± 2.06	89.12	2.45 ± 5.43	83.02
119	0.00 ± 0.00	100.00	0.05 ± 0.02	100

## 2.2 不同温度存贮后孢子萌发率测定

图1中结果表明,在4℃和22℃(条件下存贮)的孢子活性随着存贮时间的延续孢子活性逐渐降低,22℃条件下孢子活性的下降明显快于在4℃条件下存贮的孢子。在4℃存贮72d时孢子萌发率降为51.1%,而在22℃条件下孢子萌发率仅为30.6%,到79d时经4℃和22℃存贮的孢子的萌发率分别变为39.5%和15.6%,22℃存贮的孢子的萌发率在86d时已经失去萌发能力,无孢子萌发,而4℃存贮的孢子仍有16.3%的萌发率。由此表明,在22℃条件下不利于莱氏野村菌孢子粉的存贮,4℃条件下可作为临时存贮,但不宜于长时间的保存。由此,在制剂的开发中,必须开发能在22℃条件常温条件下有利于保护孢子活性物质,以保持分生孢子的活性。

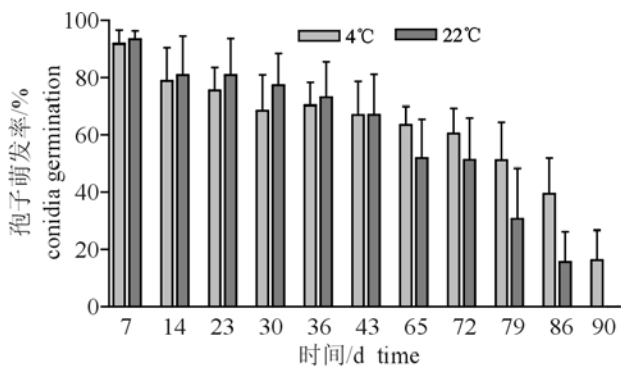


图1 莱氏野村菌不同温度存贮条件下分生孢子萌发率  
Fig. 1 Conidia germination rate under the different temperature

## 3 讨论

莱氏野村菌作为一种经典的虫生真菌,在夜蛾科害虫种群中流行性强,对害虫种群控制发挥着重要的作用,但其分生孢子在自然条件下存活时间很短的特点制约着该菌产业化的步伐。本研究中,云南本地菌株在土壤及低温及常温条件下分生孢子存活时间较短,与IGNOFFO(1985)报道相同。本研究中的云南菌株分生孢子的半衰期分别为41.4d和49.5d,两菌株间略加有一定差异,同时该研究结果与据IGNOFFO(1985)报道的分生孢子室温25℃条件下保存2周就会有50%失去活性差异较大,其主要原因可能是由于菌株本身特性及分生孢子粉的含水量等有差异。同时云南地处高原地区,较强的紫外线也可能是引发该菌发生诱变而增强了抗逆性。

莱氏野村菌虽然存活时间较短,但在害虫种群

中发生流程度高,尤其是在夜蛾科害虫发生危害较为集中的菜田和豆田,该菌引发的流行病在夜蛾类害虫种群控制中具有重要作用,再加上许多鞘翅目、鳞翅目害虫均有在地下越冬的习性。然而,但对于该菌在害虫越冬代中发生及传播尚无系统研究,因此对于该菌在土壤中的存活形式、存活生物生态学特征及传播途径的研究还将是该菌系统开发研究重要内容。

本研究中仅测定了不同温度下所贮存的分生孢子的萌发率,而未研究不同温度存贮下孢子侵染力的变化。据LOPES等(1995)报道,莱氏野村菌黎豆夜蛾菌株分生孢子在4℃下贮存3个月后也能引起黎豆夜蛾死亡,但死亡率比以前有所降低<sup>[16]</sup>。由此对于该菌株在不同温度条件下贮存后的侵染力的变化还将是系统综合评价和利用的重要内容之一。

## [参考文献]

- [1] IGNOFFO C M, GARCIA C. Host spectrum and relative virulence of an Ecuadoan and a Mississippian biotype of *Nomuraea rileyi* [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1985, 45(3): 346-352.
- [2] 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.
- [3] 蒲蛰龙, 李增智. 昆虫真菌学 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1996.
- [4] AMBETHGAR V, LOGANATAN M. Incidence of green muscardine fungus, *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson on *Spodoptera litura* (Fab.) in soybean, *Glycine max* (L.) Merrill from Tamil Nadu (India) [J]. *Journal of Entomological Research*, 1998, 22: 195-196.
- [5] DEVI P S, PRASAD Y G, CHOWDARY D A, et al. Identification of virulent isolates of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (F) Samson for the management of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura* [J]. *Mycopathologia*, 2003, 156(4): 365-373.
- [6] PORNPOJ S, CHANPEN W, SOMSAK P. Studies on the pathogenesis of the local isolates of *Nomuraea rileyi* against *Spodoptera litura* [J]. *Science Asia*, 2005, 31(3): 273-276.
- [7] 王长军. 莱氏野村菌寄生害虫规律和虫种的调查研究 [J]. *杀虫微生物专刊*, 2000, (15): 253-254.

(下转第765页)

3 结论与讨论

甘蔗宿根矮化病(ratoon stuning disease, RSD)是普遍存在于所有植蔗地区的一种世界性的重要病害,由一种棒杆菌属细菌(*Clavibacter xyli* subsp. *xyli*)寄生于蔗株的维管束中引起,由于无明显的外部 and 内部症状,病原菌又难以分离和培养,传统诊断方法极其困难,所以长期以来为人们所忽略,并在没有任何检测和防控措施的有利条件下得以任意传播,扩展蔓延。本研究利用从澳大利亚引进的RSD标准抗原抗体,建立了I-ELISA检测甘蔗宿根矮化病(RSD)的方法,并通过对田间采集的样本进行检测,同时以电镜负染检测法印证,检测结果一致,表明I-ELISA能简便、快速、准确、有效的检测出RSD。电子显微镜和I-ELISA两种方法结合可提高RSD的检出率和准确性。

云南红河、开远、新平3地甘蔗宿根矮化病的田间检测结果表明,3地均检测出RSD,共检测的42个样品中,有29个样品为阳性占69.05%,其中红河的10个样品中有6个样品为阳性占60%,开远的17个样品中有13个样品为阳性占76.47%,新平的15个样品中有10个样品为阳性占

66.67%,由此可见,RSD在云南蔗区发生已非常普遍。

RSD是一种重要的细菌性病害,对甘蔗造成的损失比任何一种甘蔗病害都大,且传播性极强,其对甘蔗生产有潜在的威胁,本研究仅对云南少部蔗区进行了调查,应进一步对RSD在云南各蔗区的发生情况、田间流行动态和防治技术(脱毒种苗生产)及PCR检测技术进行深入研究,为RSD的有效防控提供技术支撑。

[参考文献]

- [1] 陈庆龙译. 世界甘蔗病害[M]. 北京:农业出版社, 1982.
- [2] 黄应昆,李文凤. 甘蔗主要病虫害原色图谱[M]. 昆明:云南科技出版社,2002.
- [3] 黄孟群,肖镇杰. 广东甘蔗宿根矮化病调查报告[J]. 甘蔗糖业,1987,(2):39-40.
- [4] 郑加协,甘勇辉. 福建甘蔗宿根矮化病的发生及其诊断[J]. 甘蔗糖业,1998,(5):20-24.
- [5] 邓展云,王伯辉,刘海斌,等. 广西甘蔗宿根矮化病的发生及病原检测[J]. 中国糖料,2004,(3):35-38.



(上接第755页)

- [8] 李世广,林华峰. 不同条件下几种虫生真菌对棉铃虫的侵染致病效应[J]. 华东昆虫学报,2003,12(1):29-34.
- [9] MOHAMED A K A. Histopathology of *Nomuraea rileyi* in larvae of *Heliothis zea* and in vitro enzymatic activity [J]. J. Invertebr. Pathol,1978,31:345-352.
- [10] 涂增,翟逸,万永继. 环境因子对莱氏野村菌cq菌株生长发育的影响[J]. 西南农业大学学报,2006,28(1):49-53.
- [11] 黄桂英,左天兴,任金龙,等. 粉拟青霉菌、莱氏野村菌防治松小蠹虫试验[J]. 林业调查规划,2005,30(4):109-111.
- [12] 王滨,聂英奇,李增智,樊美珍. 白僵菌在土壤中宿存的量、毒力及产孢量变化研究[J]. 安徽农业大学学报,2003,30(1):40-43.
- [13] 樊美珍. 绿僵菌在土壤中宿存形态和存活时间的测定[J]. 西北林学院学报,1991,6(3):48-54.
- [14] 樊美珍,李增智. 绿僵菌在土壤中的延续及控制桃小食心虫的潜力[J]. 应用生态学报,1996,7(1):49-55.
- [15] 陈斌,邓裕亮,李正跃,等. 绿僵菌对小云斑金龟幼虫的毒力及其在土壤中的宿存[J]. 西南农业大学学报,2004,26(5):580-583.
- [16] LOPRES M I, BARROS N M DE, DE BAE EOS NM. Virulence of stored conidia of *Nomuraea rileyi* against soybean caterpillar, *Anticarsa gemmatilis*[J]. Ciencia Rural,1995,25(2):197-200.