

绿僵菌在土壤中宿存的数量及产孢量变化研究

程子路, 郭立佳, 黄俊生

(中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海南儋州 571737)

摘要:研究了 MA4、JF842、JF86C、JF883 和 JF813E 五个绿僵菌菌株在土壤中宿存情况, 结果表明, 绿僵菌在土壤中宿存两个月内, 成菌落数呈波动状态, 下降较慢, 自第 3 个月起, 成菌落数下降较快, 最终除 JF842 外土壤中的成菌落数维持在 $10^3 \sim 10^4$ CFU/土样水平。其中 JF86C、JF883 的宿存能力相对较强, 比较适合用于田间应用; 而绿僵菌在宿存过程中, 其产孢能力的稳定性有利于害虫的持续控制。

关键词:绿僵菌; 成菌落数; 产孢量; 宿存

中图分类号: S476+.12 **文献标识码:** A

The Dynamic of Population and Sporulation of *Metarrhizium anisopliae* Survived in Soil

Cheng Zilu, Guo Lijia, Huang Junsheng

(Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Danzhou Hainan 571737)

Abstract: The research on the survival ability of *Metarrhizium anisopliae* (MA4, JF842, JF86C, JF883, JF813E) shows that the CFUs (colony forming unit) of *Metarrhizium anisopliae* survived in soil decreased slowly within the first two months, but after two months, the CFUs dropped sharply every month. The CFUs of *Metarrhizium anisopliae* could be monitored in level of $10^3 \sim 10^4$ CFU/sample after 1 year. JF86C and JF883 have more strong survival ability in soil. Too high quantity of spores was detrimental to the long survival of *Metarrhizium anisopliae*. The sporulation of *Metarrhizium anisopliae* kept relatively stable in soil.

Key words: *Metarrhizium anisopliae*, CFU, sporulation, survival ability

绿僵菌(*Metarrhizium anisopliae*)是一种重要的昆虫病原真菌, 其寄主范围广, 可在 8 个目 30 个科 200 余种害虫上寄生, 且有些菌株对林木食叶性害虫马尾松毛虫也表现出较强的毒力^[1-3], 具有广阔的应用前景。利用绿僵菌制剂来防治地下害虫已得到许多学者的重视^[4-9], 同时, 绿僵菌不但能够寄生昆虫, 而且能够在生态系统中寄主昆虫缺乏的时候, 在不同的生境中营腐生生活^[10-15]。因此, 研究绿僵菌在生态系中, 尤其在土壤中的宿存情况, 有利于更好地利用这种重要的昆虫病原真菌持续、有效地控制有地下生活史的农林害虫。该研究从郭立佳师兄分离鉴定的 36 个绿僵菌菌株中,

挑取 4 个生物学性状较好的菌株, 并参照王滨对于白僵菌宿存能力研究的方法通过选择性培养基(已有配方)定期检测土壤中绿僵菌的数量对五个绿僵菌菌株进行宿存的研究。

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点

研究田间试验于 2007 年 5 月到 2008 年 3 月于中国热带农业科学院海口院区大田进行。

1.2 材料

绿僵菌孢子粉: 由实验室分离保存, 孢子粉含量为 1×10^{11} 孢子/g。

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2007BAD48B02); 科技部“国家科技基础条件平台工作”(2005DKA21201)。

第一作者简介: 程子路, 男, 1983 年, 浙江省永康市, 硕士, 主要研究方向为微生物农药。通信地址: 571101 海南省龙华区学院路四号热带生物技术研究所 A-307, E-mail: chengzilu@163.com。

通讯作者: 黄俊生, 男, 1963 年, 广东汕头, 所长/研究员, 博士, 博士生导师, 先后获得国家优秀留学回国人员及教育部高等院校骨干教师。主要从事分子生物学、生物化学及基因工程的科研工作。主要研究领域: 微生物农药。主持和参加多项国家级、省部级和国际合作研究项目。在国内外杂志上发表论文 60 多篇, Tel: (0)0898-23300187, E-mail: h888111@126.com。

收稿日期: 2008-03-20, 修回日期: 2008-05-15。

1.3 方法

1.3.1 绿僵菌在土壤中的数量动态 实验小区的设置: 在郁闭度 0.7 的林下土壤中, 分别用玻璃条隔成 3 个 20 cm×20 cm 的方格, 每个方格间隔 1 m。取方格内 2 cm 表层土, 分别与 3 g 绿僵菌高孢粉充分混合, 后平铺于各方格内。每方格为 1 个处理。

绿僵菌选择性培养基的制作: 按选择性培养基配方配制培养基, 灭菌后倾倒在平板并置于无菌处放置 1d, 备用。

取样: 在设置区内在不同绿僵菌处理区内五点式取土样。前两个月每 10d 取样一次, 以后每 1 个月取样一次,

每次取样厚度达 15 cm。

绿僵菌成菌落数 (CFU, colony forming unit) 的测定: 每次将所取的土样置于 250 ml 的三角瓶中, 然后加入 0.05% 的灭菌吐温 -80 溶液 100 ml, 置于快速振荡器上振荡 15 min, 使之充分混匀。然后稀释成 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 和 10^{-7} 浓度, 每次稀释均需充分震荡以使混合均匀。然后用微量移液器精, 每次稀释均需充分震荡以使混合均匀。然后用微量移液器精确移取各浓度土壤悬液 0.3 ml 于制好的选择性培养基上铺平板。各浓度均设 3 个重复。

将平板置于 25℃ 培养箱中培养, 观察、记录各培

养皿中绿僵菌的成菌落数。选取适宜浓度的绿僵菌成菌落数作为测定数据 (CFU 值在 10~100 之间为宜)。

1.3.2 宿存对绿僵菌产孢量的影响 孢悬液的制备: 取各分离株的高活力孢子 (萌发率 >95%) 配成 1×10^8 个孢子 /ml 浓度的孢悬液。

铺平板: 制备 SDAY 培养基并在表面铺上灭菌的玻璃纸, 用微量移液器移取各分离株孢悬液 0.3 ml 铺平板, 每一分离株铺设 3 个平板。置于 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养箱中培养 15 d。

产孢量的测定: 用 6.8 mm 的圆柱形打孔器在每个培养皿上打 3 个菌落, 每个分离株共打 9 个菌落。每 3 个菌落置于装有 10 ml 0.05% 吐温 -80 的大试管中, 在快速混匀器上震荡 10 min, 使白僵菌孢子充分分散。梯度稀释至适宜浓度, 用血球计数板在显微镜下计数, 计算各分离株的产孢量。

2 结果与分析

2.1 绿僵菌在较短时间内宿存的数量动态

绿僵菌在土壤中的宿存受到土壤中生物的和非生物的因素影响, 其数量动态受到土壤湿度、温度和生物的直接影响, 尤其紫外线对表层土中的绿僵菌孢子的杀伤作用, 均能导致孢子的大量死亡。头 2 个月从土壤中分离的绿僵菌成菌落数值如表 1 所示。

表 1 绿僵菌在 60d 内宿存的数量动态 ($10^6\text{CFU}/\text{土样}$)

时间	JF86C	JF813E	JF842	MA4	JF883
10d	146.34a	124.56b	101.1c	126.01b	156.33a
20d	99.87a	58.96b	47.74c	57b	95.36a
30d	60.63a	40.6c	39.87c	48b	60.34a
40d	70.37a	50.8c	49.35c	60.99b	63.45b
50d	53.68b	43.57c	34.01d	35.7d	60.53a
60d	60.79a	45.67b	30.17c	45.87b	59.35a

从表中可以看出, 在绿僵菌宿存的前 10d 内, 绿僵菌的成菌落数逐渐下降, 而在 40d 和 60d 时出现了 CFU 值的反弹, 因此, 呈现处初期持续下降, 而后期呈现波浪状的特征。对各个时期不同种的绿僵菌成菌落数进行方差分析, 发现总体来说 JF86C 与 JF883 这两个菌种在土壤中的宿存能力较强。而 JF842 成菌落数较少, 而且下降较其它菌种最快, CFU 值反弹也较少。在这 60d 的观察中, 最值得关注的是绿僵菌成菌落数在宿存过程中的波浪型变动情况。在前 30d 各种绿僵菌成菌落数下降速度较快, 均达到或接近半数。而在 40 到 60d 内, 绿僵菌孢子数却得到了较大数量的增长, 出现了一个增长峰值, 然后又下降。这可能是由于, 绿僵菌被刚刚置于土壤中时, 受自身、土壤中其它生物

及非生物环境的影响较大。紫外线、土壤温湿度。动植物与微生物各种代谢活动所产生的环境理化性质的改变等, 尤其紫外线对表层土中的绿僵菌孢子的杀伤作用, 均能导致孢子大量死亡。而一部分存活的绿僵菌则在土壤中营腐生长并产孢, 而绿僵菌种群数量反弹现象可能是由于土壤中绿僵菌的产孢周期及土壤有机质含量的变化所造成。

2.2 不同种绿僵菌在土壤中宿存的数量动态

以 1 年为周期, 每隔 1 个月取样调查一次土壤中的绿僵菌种群数量。如图 1 所示。

绿僵菌在土壤中宿存的起始阶段 (2 个月), 种群数量损失较少, 成菌落数较大, 达到 107 数量级。7 月到 10 月绿僵菌种群损失较大, 可能是由于夏季高温、干

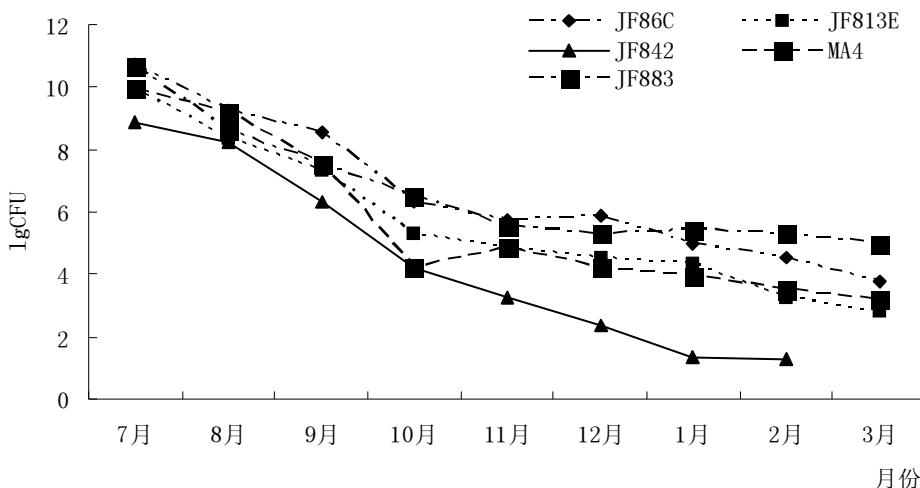


图1 绿僵菌1年内土壤中的数量动态

燥的不利环境，致使绿僵菌失去活力，其中 JF86C、JF883 相对其它菌种具有较强的宿存能力。从 10 月到 1 月除了 JF842 以外其它绿僵菌种群的损失有所减少。其中 MA4 在第 11 月时菌种数量较第 10 月有所反弹，JF86C 在第 12 月也出现了相同的现象，而 JF86C 菌种数量下降得较缓慢，并于一月份出现了反弹现象。这可能是由于在绿僵菌克服不利影响后，利用土壤中的有机质进行生长繁殖；加上 10 月份后，气温逐渐降低，再加上秋季的落叶腐烂，为绿僵菌的生长又提供了一个较为适宜的生长环境。在随后的 2 个月，JF842 菌落数量一直下降到无法用选择性培养基检测出来，其它绿僵菌成菌落数有着一定程度的降低，但其衰减率远远低于盛夏季节。其中以 JF86C 及 JF883 菌种数量最稳定，宿存能力较强。

2.3 宿存对产孢量的影响

产孢量分析结果发现(表 2)不同时期从土壤中分离得到的分离株都具有较强的产孢能力。培养基表面均有一层均匀的绿僵菌孢子层。

表 2 各菌株产孢量

菌株	产孢量(10 ⁷ 个)
JF86C	8. 7ab
JF813E	5. 8c
JF842	4. 5c
MA4	7. 2b
JF883	9. 5a

根据各分离株的产孢量结果，产孢量的差异并不随宿存时间的长短而呈规律性的变化，只是 7 月、8 月、9 月、10 月这 4 个气温较高月份分离的分离株产孢量低于 12 月、1 月、2 月这 3 个气温较低月份的分离株。初始分离株的产孢量高于其它分离株，这意味着在土壤中的宿存有可能影响到菌株的产孢量；但产孢量

的变化是由于遗传变异，还是由于环境影响而发生的表达变化?仍需进一步研究。绿僵菌的产孢量并不是宿存时间越长，产孢量越低，作为绿僵菌生物学的一个特征指标，似乎又保存着相对的稳定性。

3 讨论

金龟子绿僵菌不仅是蛴螬、步甲等鞘翅目地下害虫的常见病原菌，还对小菜蛾、菜青虫、桃小食心虫等鳞翅目害虫都具有一定的毒杀作用^[16-22]，绿僵菌孢子进入土壤后，一般以分生孢子形态宿存，在温湿度及营养条件适合时，可侵入寄主萌发形成菌丝^[22]，因此分生孢子在土壤中的延续能力直接影响到病原菌杀虫作用的发挥。该试验证实了 JF883 及 JF86C 绿僵菌在土壤中的较强宿存能力及产孢水平。在起始浓度为 10⁷~10⁸CFU/ 土样的土壤中，经过近 1 年的宿存，仍可在 10³~10⁴ 水平上检测到绿僵菌的存在，这种较强的宿存能力对农林害虫，尤其有土壤生活史害虫的控制具有重要的意义。

参考文献

- [1] 李增智,程双龙,鲁绪祥.绿僵菌、黄僵菌对松毛虫的室内杀虫及固体生产试验初报[J].安徽农学院学报,1985,2:85-90.
- [2] 宋漳,景云,蔡和谦,等.应用绿僵菌防治马尾松毛虫初探[J].福建林学院学报,1997,17(2):107-109.
- [3] 江英成.绿僵菌和白僵菌侵染马尾松毛虫试验比较[J].浙江林学院学报,2000,17(4):410-413.
- [4] WeinerJEBM,KennedyC.Growthandvariabilityin2crowdedanduncrowdedpopulationsofdwarfmarigold (TagetesPatula) [J].AnnalsofBotany,1990,65:513-524.
- [5] 张思玉.桫欏群落内主要乔木种群的种间联接性[J].应用与环境生物学报,2001,7(4):335-339.
- [6] 张思玉,郑世群.永定桫欏群落的结构特征[J].应用与环境生物学报,2001,10(3):30-34.
- [7] 尚进,李旭光,石胜友.重庆涪陵磨盘沟桫欏种群结构与分布格局研

- 究[J].西南农业大学学报,2003,25(3):197-199.
- [8] 张跃西,钟章成.亚热带次生常绿阔叶林乔木优势种邻体干扰竞争模型的研究.见:钟章成.植物生态学研究进展[M].重庆:西南师范大学出版社,1997:278-284.
- [9] 张跃西,钟章成.亚热带次生常绿阔叶林优势种间的竞争效应与竞争反应[J].应用与环境生物学报,2003,9(4):333-335.
- [10] 张继祖,徐金汉.中国南方地下害虫以及其天敌[M].北京:中国农业出版社,1996:151-157.
- [11] 魏鸿均,黄文琴.中国地下害虫研究概述[J].昆虫知识,1992,29(3):168-170.
- [12] 冀凌芝.马铃薯地下害虫防治技术[J].现代农业,2001,12:20.
- [13] 徐庆丰.我国研究和利用白僵菌防治农林害虫及有关问题的探讨[A].中国虫生真菌研究与应用(第1卷)[C].北京:学术期刊出版社,1988:1-9.
- [14] 王滨,樊美珍,李增智.球孢白僵菌选择性培养基的筛选[J].安徽农业大学学报,2000,27(1):23-28.
- [15] 蒲蛰龙,李增智.昆虫真菌学[M].合肥:安徽科学技术出版社,1996:592-607.
- [16] Bustillo A E, Bernal M G, Benavides P, et al. Dynamics of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* infecting *Hypothenemus hampei* (Coleoptera : Scolytidae) populations emerging from fallen coffee berries[J]. FLORIDA ENTOMOLOGIST, 1999, 82 (4): 491-498.
- [17] De la Rosa W, Alatorre R, Barrera J F, et al. Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) up-on the coffee berry borer (Coleoptera : Scolytidae) under field conditions[J]. JOURNAL OF ECONOMIC ENTOMOLOGY, 2000, 93 (5): 1409-1414.
- [18] 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.
- [19] 马峻, Richard J, Milner.小菜蛾对绿僵菌的感染反应[J].中国生物防治,2000,16(1):15-18.
- [20] 赵俊生,郭素萍,武慧贞,等.应用绿僵菌防治鳞翅目蔬菜害虫及壮苗度试验[J].植物保护,2001,27(5):29-30.
- [21] 赵俊生,郭素萍,武慧贞,等.利用绿僵菌防治鳞翅目害虫研究[J].山西农业科学,2000,28(2):69-71.
- [22] 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.