

三株丝孢虫生真菌对松墨天牛幼虫的感染效应*

李庚祥, 陈 斌**, 李正跃, 杨 洋

(农业生物多样性与病虫害控制教育部重点实验室, 生物多样性研究与应用技术
国家工程中心, 云南农业大学 植物保护学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 生物测定了球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*) Bb050715, Bb060721 菌株和粉拟青霉 (*Paecilomyces farinasus*) Pf0607 菌株对松墨天牛 (*Monochamus alternatus* Hope) 的感染效应。结果表明, 球孢白僵菌及粉拟青霉对松墨天牛幼虫的毒力有一定的差异, 3 株丝孢真菌侵染三龄幼虫后, 均造成虫体血淋巴中蛋白质含量降低, 且球孢白僵菌侵染后血淋巴中总蛋白含量明显低于经粉拟青霉接种处理感染后的虫体。供试 3 菌株中, 球孢白僵菌菌株处理后天牛累积死亡率明显高于粉拟青霉菌株, 对天牛幼虫感染的剂量效应参数分别为 0.45, 0.45 和 0.39, 对松墨天牛三龄幼虫的毒力回归方程分别为 $Y = 13.537X - 4.6032$ ($R^2 = 0.97$), $Y = 15.361X + 0.4444$ ($R^2 = 0.97$) 和 $Y = 9.138X - 3.1001$ ($R^2 = 0.99$)。在 $1.36 \times 10^4 \sim 1.36 \times 10^9$ 孢子/mL 下处理后第 4 d 才出现死亡, Bb050715, Bb060721 和粉拟青霉 3 菌株接种处理后第 4~8 d 的累积死亡率分别为 13.3%~80.0%, 13.3%~86.7%, 6.7%~53.3%, LT_{50} 依次为 5.1, 5.1 和 7.7 d, 第 5 d 的 LC_{50} 分别为 7.23×10^8 孢子/mL, 1.53×10^8 孢子/mL, 7.27×10^9 孢子/mL。

关键词: 松墨天牛; 球孢白僵菌; 粉拟青霉; 蛋白质含量; 毒力

中图分类号: S 476 文献标识码: A 文章编号: 1004-390X (2009) 01-0047-04

Infection Effect of Three Isolates of Entomopathogenic Fungi against the Larvae of the *Monochamus alternatus* Hope

LI Geng-xiang, CHEN Bin, LI Zheng-yue, YANG Yang

(Key Laboratory of Agro-biodiversity and Pest Management of Education Ministry of China, The National Center for Agro-biodiversity, College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: The infection effect of isolates of Bb050715 and Bb060721 strains of *Beauveria bassiana*, and the strain of Pf0607 of *Paecilomyces farinasus* against the larvae of pine sawyers, *Monochamus alternatus* Hope were tested in laboratory. The result showed that the virulence was different between *B. bassiana* and *P. farinasus*, and the protein content in haemolymph of the 3rd instar larvae of the *M. alternatus* infected by the isolates of *B. bassiana* decreased obviously and was less than that of the larvae infect by *P. farinasus*. The cumulative mortality of the 3rd instar larvae of the *M. alternatus* infected by the isolates of *B. bassiana* were obviously higher than that of the larvae infect by *P. farinasus*. The dose-effect parameters of the tested isolates were 0.45, 0.45 and 0.39, respectively, on larvae of the *M. alternatus*. The virulence equation was $Y = 13.537X - 4.6032$ ($R^2 = 0.97$), $Y = 15.361X + 0.4444$ ($R^2 = 0.97$) and $Y = 9.138X - 3.1001$ ($R^2 = 0.99$), respectively. The LT_{50} was 5.1, 5.1 and 7.7 days, separately. Its LC_{50} on the larvae against sawyer was 1.38×10^8 spores/mL.

收稿日期: 2008-02-25 修回日期: 2008-04-14

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (30860005); 云南省科技厅重点攻关项目 (2005NG03); 云南省自然科学基金项目 (2008CO65M)。

作者简介: 李庚祥 (1980-), 男, 硕士研究生, 主要从事松墨天牛生物防治研究。

** 通讯作者 Corresponding author: 陈斌, 男, 副教授, 主要从事昆虫学研究。

The cumulative mortalities were 13.3% ~ 80% , 13.3% ~ 86.7% , 6.7% ~ 53.3% , respectively, after the inoculation of the dosage of $1.36 \times 10^4 \sim 1.36 \times 10^9$ spores/mL, and the first mortality was in the 4th day after treatment. The LC_{50} in the day 5 was 7.23×10^8 spores/mL, 1.53×10^8 spores/mL, 7.27×10^9 spores/mL.

Key words: *Monochamus alternatus*; *Beauveria bassiana*; *Paecilomyces farinasus*; protein content; virulence

松墨天牛 (*Monochamus alternatus* Hope) 又名松褐天牛、松天牛, 是我国及东亚各国松树 (*Pinus* spp.) 的重要蛀干害虫^[1,2], 也是传播林木毁灭性病害松材线虫病 (*Bursaphelenchus xilophilus*) 的媒介^[3,4]。有效控制松墨天牛, 不仅能防止其对松树造成直接危害, 更重要的是可以控制松材线虫病的发生和蔓延。因此, 普遍认为, 控制松材线虫病的关键是控制松墨天牛这种传播媒介, 国内外都不断地在探索着有效的治理措施。化学防治和引诱剂诱捕是该虫防治的重要措施^[5,6], 利用天敌开展生物防治也已成为普遍关注的防治措施之一^[7~10]。松墨天牛的天敌有 97 种, 其中病原微生物 17 种, 天敌昆虫 47 种, 捕食性鸟类 33 种 (6 目 16 科), 在调节和控制害虫的种群数量上发挥着重要作用^[7,8]。对松墨天牛天敌生物的应用主要集中于丝孢类虫生真菌的研究和应用上, 其中白僵菌、绿僵菌等丝孢真菌对松墨天牛的生防作用方面研究进展较快^[11,12]。球孢白僵菌和粉拟青霉作为经典的丝孢虫生真菌, 在侵染过程中, 通过菌丝穿透体壁侵染寄主, 进入血腔, 克服寄主的防御系统, 并在血腔中大量繁殖, 从而引起寄主的一系列血淋巴生理病理变化。因此, 本研究采用云南当地 3 株丝孢真菌菌株, 测定了对云南松墨天牛幼虫的毒力及侵染后对天牛幼虫血淋巴蛋白含量的影响等感染效应, 为系统评价丝孢真菌菌株对松墨天牛的毒力, 持续控制松树萎蔫病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1.1 材料

供试菌种: 球孢白僵菌菌株 Bb050715, Bb060721 分别分离自罹病小菜蛾和桃蚜体上; 粉拟青霉 Pf0607 来自德宏林场粉拟青霉制剂。

供试昆虫: 松墨天牛 (*Monochamus alternatus* Hope) 幼虫来源于玉溪市江川县前卫镇三石河地区及华宁县东山林场, 通过实地调查, 在两个林

区截取携带天牛幼虫的云南松木段运回实验室, 剥取松墨天牛幼虫。带回实验室的松墨天牛幼虫采用培养皿单头饲养, 将锯木粉和培养皿灭菌后, 进行饲养。将有松墨天牛的培养皿放入温度为 26 °C, 湿度为 70% 的人工气候箱中饲养。每隔 10 d 用注射器均匀的加入一定量的蒸馏水, 以保证培养基的湿度。

孢子悬液的制备: 把菌株接种在 SDAY 平板上, 在 25 °C 培养箱内培养 7 d。待充分产孢后, 刮取一定量的孢子, 用含 0.1% 吐温 - 80 湿润剂的 0.003 mol/L KH_2PO_4 缓冲液将菌株的分生孢子粉制成分布均匀的 1.0×10^8 孢子/mL 的孢子悬浮液, 在高速分散器上充分振荡均匀, 血球计数板计数, 将各处理配制成 $1.36 \times 10^4 \sim 1.36 \times 10^9$ 孢子/mL 孢子悬液备用。

1.1.2 生物测定

每一菌株为一处理, 采用浸渍法接种。将分布均匀的 10^9 孢子/mL 的孢子悬浮液稀释成 1.0×10^8 , 1.0×10^7 , 1.0×10^6 , 1.0×10^5 , 1.0×10^4 孢子/mL 5 个浓度梯度, 每个浓度梯度测定 15 头幼虫, 每个处理设 3 个重复。连续定时观察 10 d, 记录每天的死亡虫数。以 0.05% 吐温 - 80 溶液作对照, 每个重复测定 15 头幼虫。接种后单头放入纯锯木粉培养基中, 置于人工气候箱内饲养。每两天向培养基中加入 2 mL 无菌水, 以保持湿度。每天定时观察、记录各处理的死亡情况。发现天牛死亡的, 将死虫移出放于盛有湿润滤纸的培养皿内, 25 °C 保湿培养, 以虫体表面长出子实层为有效致死, 持续观察 10 d, 并统计死亡率及致死中时 (LT_{50})。

1.1.3 蛋白质含量测定

蛋白含量的测定方法采用考马斯亮蓝 G. 250 法^[13]。从三龄天牛幼虫接菌第 2 d 开始, 每 24 h 取 5 头天牛幼虫, 在冰浴条件下, 剪开天牛幼虫腹足收集血淋巴于离心管中 (提前冷冻且加入少许苯基硫脲), 然后在 4 °C, 3 000 r/min 离心

3 min, 除去血细胞备用。

1.2 数据统计

利用 DPS 数据处理系统 CLL 模型 (时间 - 剂量 - 死亡率模型) 模型处理生物测定数据^[14]。统计天牛幼虫的累积死亡率, 并采用机率值分析法, 以时间 (d) 的对数值为 X, 死亡率的机率值为 Y, 计算毒力回归方程和致死中时 (LT₅₀)。

2 结果与分析

2.1 丝孢真菌菌株对松墨天牛幼虫的毒力测定

2.1.1 虫生真菌对天牛幼虫的毒力回归方程

结果表明, 供试球孢白僵菌及粉拟青霉菌株对天牛幼虫均具有不同程度的毒力, 各菌株的毒力间有一定差异, 其中球孢白僵菌菌株处理后天牛累积死亡率明显高于粉拟青霉菌株, 各供试菌株对天牛幼虫感染的剂量效应参数分别为 0.45, 0.45, 0.39, 对天牛幼虫的毒力回归方程分别为 $Y = 13.537X - 4.6032$ ($R^2 = 0.97$), $Y = 15.361X + 0.4444$ ($R^2 = 0.97$) 和 $Y = 9.138X - 3.1001$ ($R^2 = 0.99$)。在 $1.36 \times 10^4 \sim 1.36 \times 10^9$ 孢子/mL 下处理后第 4 d 才出现死亡, Bb050715, Bb060721 和 Pf0607 处理后, 天牛的累积死亡率为 13.3% ~ 80%, 13.3% ~ 86.7%, 6.7% ~ 53.3%。

2.1.2 松墨天牛幼虫的累积死亡率

利用球孢白僵菌菌株和粉拟青霉菌株分生孢子悬乳液 $1.36 \times 10^4 \sim 1.36 \times 10^9$ 孢子/mL 浓度处理松墨天牛幼虫, 接种处理后第 4 d 才出现死亡 (图 1)。Bb050715, Bb060721 和 Pf0607 接种处理后第 4 ~ 8 d 的累积死亡率分别为 13.3% ~ 80.0%, 13.3% ~ 86.7%, 6.7% ~ 53.3%, 在 1.0×10^6 孢子/mL 下 LT₅₀ 依次为 5.1 d, 5.1 d 和 7.7 d, 第 5 d 的致死中浓度 (LC₅₀) 分别为 7.23×10^8 孢子/mL, 1.53×10^8 孢子/mL, 7.27×10^9 孢子/mL。由此表明, 球孢白僵菌 2 菌株对松墨天牛幼虫的致死剂量间无明显差异, 低于粉拟青霉菌株, 即球孢白僵菌菌株对松墨天牛幼虫的毒力高于粉拟青霉菌株。

2.1.3 虫生真菌对天牛幼虫的致死时间与致死剂量

致死中时 LT₅₀ 结果表明, 在 1.0×10^6 孢子/mL 下 Bb050715, Bb060721 和 Pf0607 对天牛幼虫的致死中时不同, LT₅₀ 依次为 5.1, 5.1, 7.7 d。由此表明, 粉拟青霉菌株对天牛幼虫的致死时间较长, 均在 5 d 以上, 其中粉拟青霉菌株处理后 LT₅₀ 达

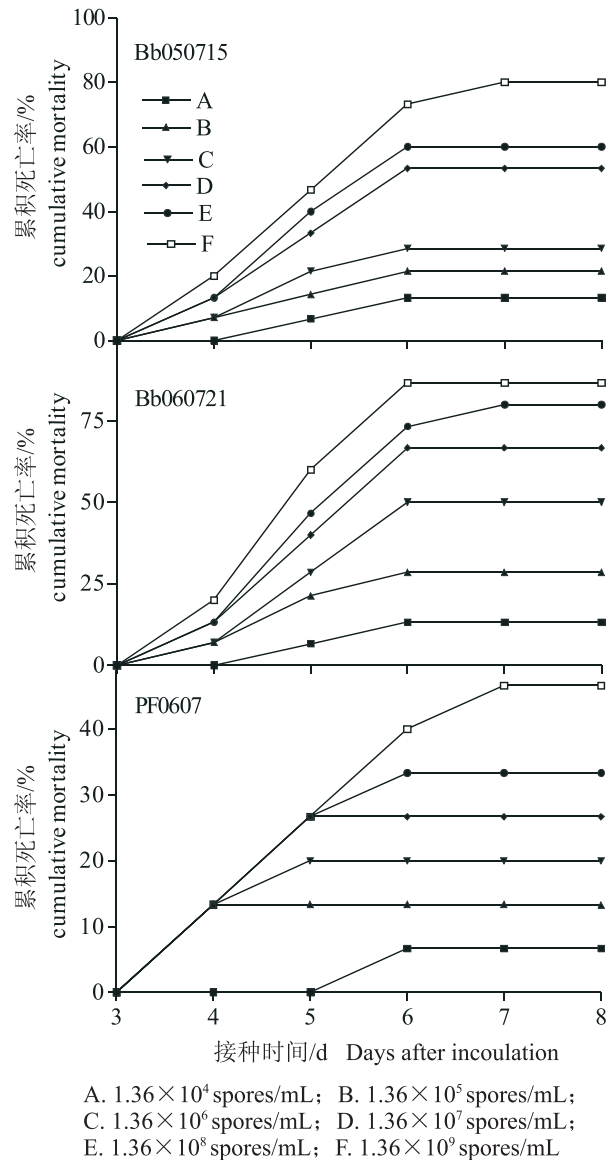


图 1 丝孢真菌对松墨天牛幼虫的感染死亡率

Fig. 1 Cumulative mortality of larvae of *Monochamus alternatus* after inoculated with three isolates of hyphomycetes fungi

7.7 d, 即供试球孢白僵菌及粉拟青霉菌株对松墨天牛幼虫种群增长的抑制作用时效差异较大。

致死剂量来看, Bb050715 接种后第 4 ~ 7 d 的 LC₅₀ 值分别为 2.47×10^{11} 孢子/mL, 7.23×10^8 孢子/mL, 3.23×10^7 孢子/mL, 2.6×10^7 孢子/mL; 菌株 Bb060721 接种后第 4 ~ 7 d 的 LC₅₀ 剂量值分别为 2.15×10^{11} 孢子/mL, 1.53×10^8 孢子/mL, 4.1×10^6 孢子/mL, 3.32×10^6 孢子/mL; 而粉拟青霉菌接种后第 4 ~ 7 d 的 LC₅₀ 剂量值分别为 5.24×10^{11} 孢子/mL, 7.27×10^9 孢子/mL, 1.3×10^9 孢子/mL, 9.77×10^8 孢子/mL。由此表明, 球孢

白僵菌 2 菌株对松墨天牛幼虫的致死剂量间无明显差异,而低于粉拟青霉菌株,即球孢白僵菌菌株对松墨天牛幼虫的毒力高于粉拟青霉菌株。

2.2 松墨天牛幼虫体内蛋白质含量的变化

对三龄松墨天牛幼虫接种丝孢真菌后,血淋巴中蛋白质含量的变化如图 2 所示。健康的三龄松墨天牛随虫体的生长发育,血淋巴中蛋白质含量在龄中呈增长趋势。经真菌感染后血淋巴中蛋白质含量的变化趋势同健康松墨天牛的变化趋势相同,但从接菌的第 2 天开始就显著低于对照,即处理后第 2 天,正常三龄松墨天牛血淋巴中蛋白质含量为 (135.6 ± 6.7) mg/mL,而处理组的为 (106.5 ± 8.9) mg/mL, (120.4 ± 10.3) mg/mL 和 (126.6 ± 7.8) mg/mL。侵染后第 7 d,对照组天牛幼虫的血淋巴中蛋白含量为 (159.8 ± 9.8) mg/mL,而感染 Bb050715, Bb060721 和 Pf0607 菌株的虫体血淋巴中蛋白含量分别为 (67.5 ± 8.9) mg/mL, (86.4 ± 7.6) mg/mL 和 (98.9 ± 10.7) mg/mL。由此表明,丝孢真菌侵染三龄松墨天牛幼虫后均造成虫体血淋巴中蛋白质含量降低,球孢白僵菌侵染后血淋巴中总蛋白含量明显低于经粉拟青霉接种处理感染后的虫体。

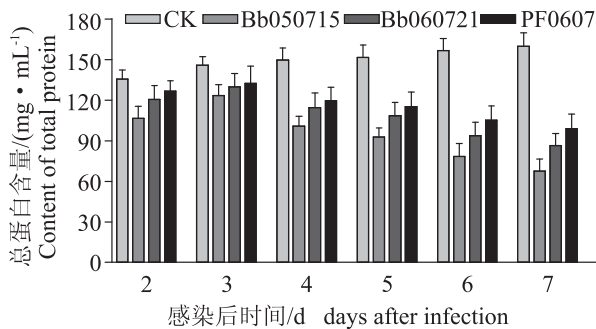


图 2 感染丝孢类真菌后天牛血淋巴中蛋白质含量变化
Fig. 2 Change of the protein content in haemolymph of *M-alternatus* infected by entomopathogenic fungi

3 讨论

(1) 本研究中仅测定了室内球孢白僵菌 2 菌株和粉拟青霉菌株对松墨天牛幼虫的感染效应,因成虫数量有限未测定其对成虫的毒力。然而,应用真菌防治松墨天牛时,与释放菌株接触机会更多的是天牛成虫,松墨天牛幼虫营隐蔽性生活,分生孢子难以接触天牛幼虫虫体,因此在筛选能

有效侵染天牛的高毒力菌时,需测定其对成虫和幼虫的毒力,以综合评价其对天牛的控制作用。此外,本研究所用的粉拟青霉菌株来自于已加工而成的防治松墨天牛的生防制剂,因此菌株因长时间的放置而未经复壮,可能会出现菌株的退化而导致毒力的降低。

(2) 本研究中采用了实验室人工培养基培养的丝孢真菌菌株,且其原始寄主均非天牛。据报道,松墨天牛天敌微生物有真菌、细菌和线虫,真菌有球孢白僵菌 (*Beauveria bassana*)、布氏白僵菌 (*B. brongniartii*)、金龟子绿僵菌 (*Metarhizium anisopliae*)、粉质拟青霉菌 (黄僵菌) (*Isaria farinosa*)、黄曲霉 (*Aspergillus flavus*)、轮枝霉菌 (*Verticillium* spp.) 和枝顶孢霉 (*Acremorium* Sp.); 细菌有粘质沙雷氏杆菌 (*Serratia marcescens*) 及寄生线虫 (*Steinernema feltiae*) 等^[7,8],周性恒等报道了南京地区松墨天牛幼虫病原真菌有球孢白僵菌、布氏白僵菌、金龟子绿僵菌和枝顶孢霉,其中球孢白僵菌为主^[15]。由于不同种或同种不同菌株对松墨天牛的毒力间存在较大差异^[15],不同的菌株各有其不同的专化性。因此,应加强云南松墨天牛发生区病原菌等天敌的调查和采集,为筛选重要的天牛病原真菌菌株提供理论依据。

[参考文献]

- [1] 陈鹏,刘宏屏,赵涛,等. 云南省松墨天牛危险性分析评估 [J]. 中国森林病虫, 2005, (7): 14-16.
- [2] 汤陈生,黄金水,陈青松,等. 松墨天牛的生物学特性 II: 生活习性 [J]. 华东昆虫学报, 2005, 14 (3): 209-213.
- [3] 柴希民,张国贤. 松墨天牛成虫携带松材线虫的数量 [J]. 东北林业大学学报, 2000, 28 (5): 99-101.
- [4] 杨宝君,朱克恭,周元生,等. 中国松材线虫病的流行与治理 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1995.
- [5] 赵锦年,蒋平. 松墨天牛引诱剂及引诱作用研究 [J]. 林业科学研究, 2000, 13 (3): 262-267.
- [6] KEDA T, ENDA N, YAMANE A, et al. Attractants for the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae) [J]. Applied Entomology and Zoology, 1980, 15: 358-361.

- [J]. *AGRI*, 1999, 25: 33-43
- [2] ROMANOV M N, WEIGEND S. Analysis of genetic relationships between various populations of domestic and jungle fowl using microsatellite markers [J]. *Poultry Science*, 2001, 80: 1057-1063.
- [3] SAITBEKOVA N, GAILLARD C, OBEXER - RUFF G, et al. Genetic diversity in Swiss goat breeds based on microsatellite analysis [J]. *Animal Genetics*, 1999, 30: 36-41.
- [4] MUKESH M, SODHI M, BHATIA S, et al. Genetic diversity of Indian native cattle breeds as analysed with 20 microsatellite loci [J]. *J. Anim. Breed. Genet.*, 2004, 121: 416-424.
- [5] 苗永旺, 霍金龙, 李莲军, 等. 从鸡血中快速提取高质量基因组 DNA 的研究 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2005, (12): 10-12.
- [6] YE H F C, YANG R C. POPGENE Version 1. 31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis [Z]. University of Alberta and Center for International Forestry Research, 1999.
- [7] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *Am J Hum Genet*, 1980, 32: 314-331.
- [8] Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. *Introduction to Conservation Genetics* [M]. Cambridge University Press, 2002.
- [9] Vanhala T, Tuiskula-Haavisto M, Elo K, et al. Evaluation of genetic variability and genetic distances between eight chicken lines using microsatellite markers [J]. *Poultry Science*, 1998, 77: 783-790.
- [10] 叶朗惠, 霍金龙, 苗永旺, 等. 尼西鸡遗传多样性微卫星标记分析 [J]. *动物学研究*, 2006, 27 (2): 68-74.
- [11] 叶朗惠, 苗永旺, 霍金龙, 等. 茶花鸡群体遗传多样性 [J]. *动物学杂志*, 2006, 41 (2): 37-42.
- [12] 钱林东, 陈涛, 霍金龙, 等. 武定鸡群体遗传变异的微卫星标记分析 [J]. *云南农业大学学报*, 2006, 21 (5): 651-656.
- [13] 陈涛, 霍金龙, 苗永旺, 等. 版纳斗鸡群体遗传多样性研究 [J]. *云南农业大学学报*, 2007, 22 (3): 393-395, 400.
- [14] 陈涛, 苗永旺, 霍金龙, 等. 盐津乌骨鸡微卫星 DNA 多态性研究 [J]. *云南农业大学学报*, 2007, 22 (4): 543-546.



(上接第 50 页)

- [7] 徐福元. 国内外松墨天牛天敌的研究利用进展 [J]. *世界林业研究*, 1998, (3): 41-45.
- [8] 王四宝, 樊美珍, 李增智, 等. 松墨天牛天敌微生物的研究利用进展 [J]. *昆虫知识*, 2003, 40 (4): 299-303.
- [9] 张翌楠, 杨忠岐. 松墨天牛的天敌及其对寄主的控制能力研究 [J]. *植物保护*, 2006, 32 (2): 9-14.
- [10] 杨希, 黄金水, 何学友, 等. 管氏肿腿蜂及其带菌室内防治松墨天牛幼虫试验 [J]. *福建林业科技*, 2005, 32 (3): 94-99.
- [11] SHIMAZU M, SATO H. Microbial control of the pine sawyer, *Monochamus alternatus*, by *Beauveria bassiana* [C] // *International Symposium on pine Wilt Disease Caused by pine wood Nematode*, Beijing, 1995.
- [12] 胡加付, 缪凯, 董振辉, 等. 利用白僵菌防治松墨天牛的试验研究 [J]. *安徽农业大学学报*, 2006, 33 (3): 332-336.
- [13] 李建武. *生物化学实验原理和方法* [M]. 北京: 北京大学出版社, 2002.
- [14] 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, 2002.
- [15] 周性恒, 朱洪兵, 肖文忠. 南京地区松墨天牛病原真菌的调查研究 [M] // 杨宝君, 朱克恭, 周元生, 等. *中国松材线虫病的流行与治理*. 北京: 中国林业出版社, 1995.