防治西花蓟马的病原真菌-白僵菌微菌核的液体培养*

王海鸿[1]** 王晶玲[1] 李银平[1] 刘 旋[2] 问锦曾[1] 雷仲仁[1]***

(1. 中国农业科学院植物保护研究所植物病虫害生物学国家重点实验室 北京 100193;
2. 北京城市学院生物医药学部 北京 100094)

摘 要 微菌核是许多植物病原真菌产生的越冬结构,目前还没有关于白僵菌微菌核的报道。用含不同氮源的介质培养出了2株白僵菌菌株,RSB和SZ21的微菌核。在液体培养条件下,2株菌株不仅能产生典型的芽孢和菌丝,还能产生微菌核。在以玉米粉(RSB和SZ21菌株分别为6.5×10^2和6.3×10^2 mL^{-1})为氮源的介质中产生的微菌核浓度高于以大豆粉(RSB和SZ21菌株分别为2.5×10^2和2.2×10^2 mL^{-1})为氮源的介质。菌株SZ21产生的芽孢浓度(在以大豆粉和玉米粉为氮源的介质中,分别为17.9×10^5和7.4×10^5 L^{-1})高于RSB菌株的芽孢浓度(在以大豆粉和玉米粉为氮源的介质中,分别为14.8×10^5和6.2×10^5 L^{-1})。含有硅藻土的微菌核制剂能在真空干燥(<5%湿度)后存活下来,并且对于活力没有显著影响。干燥后的微菌核颗粒在水洋菜培养基上复水和培养后,能够萌发菌丝和产生高浓度的分生孢子。将微菌核颗粒预混到土壤中能引起西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* (Pergande)土栖阶段的高死亡率。这是首次报道白僵菌的微菌核的培养,并为用虫生真菌防治土栖昆虫提供了一个新的方法。

关键词 西花蓟马,白僵菌,菌核,发酵

Liquid culturing of microsclerotia of *Beauveria bassiana*, an entomopathgeonic fungus to control western flower thrip, *Frankliniella occidentalis*

WANG Hai-Hong[1]** WANG Jing-Ling[1] LI Yin-Ping[1] LIU Xuan[2]
WEN Jin-Zeng[1] LEI Zhong-Ren[1]***

(1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Biomedical Science Division, Beijing City College, Beijing 100094, China)

Abstract Microsclerotia (MS), overwintering structures produced by many plant pathogenic fungi, have not been described for *Beauveria bassiana*. Two strains of *B. bassiana*, RSB and SZ21, formed MS in shake flask cultures using media with different nitrogen sources. Both strains produced MS in addition to typical blastospores and mycelia. Strain SZ21 (17.9×10^5 and 7.4×10^5 L^{-1} in media with soybean powder and corn flour, respectively) produced higher concentrations of MS than strain RSB (14.8×10^5 and 6.2×10^5 L^{-1} in media with soybean powder and corn flour, respectively) of *B. bassiana*. Microsclerotial preparations of *B. bassiana* containing diatomaceous earth survived vacuum-drying (to <5% moisture) with no significant loss in viability. Rehydration and incubation of vacuum-dried MS granules on water agar plates resulted in hyphal germination and sporogenic germination to produce high concentrations of conidia. Bioassays using soil-incorporated, vacuum-dried MS preparations resulted in significant infection and mortality in soil-dwelling stages of the western flower thrip, *Frankliniella occidentalis* (Pergande). This is the first report of the production of sclerotial bodies by *B. bassiana* and provides a novel approach for the control of soil-dwelling insects with this

* 资助项目:公益性行业(农业)科研项目(200803025)、国家大宗蔬菜产业技术体系(Nycytx-35-gw27)。

**E-mail: wanghaihong2020@sina.com

***通讯作者,E-mail:leizhr@sina.com

收稿日期:2011-02-28,接受日期:2011-04-28

entomopathogenic fungus.

Key words　*Frankliniella occidentalis*, *Beauveria bassiana*, sclerotia, fermentation

西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae)是世界性的多种经济作物上的一种重要害虫。西花蓟马通过锉吸取食和传播植物病毒对作物造成严重为害(Nagata and Peters, 2001;Ullman *et al.*,2002; Kirk and Terry, 2003)。西花蓟马的生活史包括地上取食阶段(成虫,1 龄和 2 龄若虫)和土栖阶段(2 龄若虫末期,预蛹和蛹)。大部分西花蓟马的老熟 2 龄若虫都表现出正趋地性和负趋光性,从植物上转移到土壤或盆栽介质中化蛹。依据寄主植物种类的不同,最多有 98% 的蓟马在地下化蛹,并分布在 1.5 ~ 2.0 cm 深的土层中,直到发育为成虫后从土壤中羽化出来再转移到地上为害(Berndt *et al.*, 2004)。此外,由于反复频繁地施用化学药剂,该虫已发展出对多种化学杀虫剂具抗性的种群(Jensen, 2000; Herron and James, 2005)。

土壤中施用虫生真菌是有效治理蓟马土栖阶段的有效措施(Brownbridge *et al.*, 1999; Ansari *et al.*, 2007, 2008)。球孢白僵菌(*Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin,以下简称白僵菌)是寄主谱广泛的重要昆虫病原真菌之一,许多商用或非商用的白僵菌菌株均能引起西花蓟马的高度侵染(Copping, 2000; Jacobson *et al.*, 2001; Ludwig and Oetting, 2002; Ugine, 2005;张素华, 2009)。用虫生真菌防治地下害虫的商用兴趣促进了相应剂型的发展。这些剂型的基础是液相培养产生的菌丝或者是在营养或非营养载体上固相培养产生的分生孢子。这些菌丝或分生孢子通常干旱耐受性差以及货架寿命较短,从而限制了它们的实际应用。

为了在土壤和腐败的植物材料中存活,许多植物病原真菌产生菌核,即紧密的菌丝聚集体,并以这些繁殖体作为越冬结构(Coley-Smith and Cooke,1971)。一些植物病原真菌,例如大豆炭疽病菌 *Colletotrichum truncatum* (Schweinitz)和大豆褐红坏死病菌 *Mycoleptodiscus terrestris* (Gerd.)(Jackson and Schisler, 1995; Shearer and Jackson, 2003)在深层液体培养发酵中,能够产生微菌核(microsclerotia, MS),即直径 200 ~ 600 μm 的菌核颗粒。作为真菌除草剂,这些杂草病原物的 MS 是土壤和水生环境中有持效侵染性的繁殖体(Shearer and Jackson, 2006; Boyette *et al.*, 2007)。Jackson 和 Jaronski (2009)报道了昆虫病原真菌绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin MS 的液体培养方法及其对甜菜根蛆(*Tetanops myopaeformis*)的防治。然而,到目前为止还没有对防治西花蓟马土栖阶段重要病原真菌 - 白僵菌 MS 培养与应用的报道。

本研究报道了用于防治西花蓟马土栖阶段的白僵菌 MS 的液体培养方法,主要评估了不同液体培养介质中生物量的累积、孢子和 MS 的产量、干旱耐受能力以及土壤中施用白僵菌 MS 的生防效率。

1　材料与方法

1.1　供试虫源

西花蓟马最初采集自北京门头沟碧坤蔬菜基地,并按 Liang(2010)所描述的方法饲养。即,在 0.5 L 的筒形玻璃容器中放入 3 ~ 4 根豆荚(*Phaseolus vulgaris* L.),将蓟马成虫转移到容器内产卵,容器放置在生长箱中,培养条件设置为温度 26℃,相对湿度 60% ~ 70%,光周期为 L: D = 13: 11,产卵 12 h 后去除成虫以确保幼虫龄期的一致。8 d 后收集 2 龄 2 d 的幼虫(L2)备用。

1.2　供试菌株

白僵菌菌株 RSB,2007 年从中国农业科学院饲养的二化螟上分离;菌株 SZ21,2010 年从辽宁绥中玉米螟上分离。2 个菌株均能高效侵染西花蓟马。每个菌株均于室温下(~22℃)在 PDA 培养基上培养 3 周。将产生孢子的琼脂平板切成 1 mm^2 的琼脂块,浸没在 10% 甘油中于 -80℃下保存。

液体培养时,将冷冻贮藏的琼脂块接种到 PDA 平板上,在室温(~22℃)下培养 2 ~ 3 周。加入含有 0.1% 的聚乙二醇油酸基化合物(吐温 -80, Sigma)的无菌水,无菌操作打散混匀、稀释,制成终浓度为 1.0×10^9 L^{-1} 的孢子悬浮液备用。

1.3　培养液成分

(1)基础盐(g · L^{-1}):KH_2PO_4,1.5、$MgSO_4$ ·

$7H_2O$,0.5、$CaCl_2 \cdot 2H_2O$,0.01;(2)微量元素(μg · L^{-1}):H_3BO_3,30、$MnSO_4 \cdot 4H_2O$,40、$CuSO_4 \cdot 5H_2O$,80 g;$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$,400、$FeCl_3 \cdot 6H_2O$,500;(3)复合维生素 B(μg · L^{-1}):硫胺,30、核黄素,15、吡哆胺,2、右旋泛酸钙,10;(4)氮源(g · L^{-1}):大豆粉,15、玉米粉,15、酪氨酸,15、酵母浸膏,15、麦麸,15 (5)碳源(g · L^{-1}):葡萄糖,25;(6)吐温 -80 (v/v):0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2。培养液的最终 pH 调至 6.8。在试验中保持基础盐、微量元素、复合维生素 B、碳源固定,检测加入不同种类氮源和不同浓度吐温 -80 组合后所得的结果。

1.4 培养条件

在 250 mL 烧杯中,装入 100 mL 培养液,接入孢子悬浮液,使孢子终浓度达到 5×10^6 L^{-1},放置于恒温摇床(温度 25℃;摇速 300 rpm)中培养。经常用手摇晃烧杯,以减少菌丝在烧杯壁上的生长。并于接种后逐日显微观察培养液中生成物的形态,第 6 天时检测生物量累积,孢子浓度和 MS 浓度。在每次实验中,从每个烧杯中取 2 次样,每种培养液设置 3 个烧杯重复。所有的实验至少重复 2 次。

1.5 培养液中生物量累积、孢子和 MS 产量检测

检测累积的生物量时,从培养烧杯中取 1 mL 培养液,真空过滤到预称重的滤纸上。滤纸于室温下真空干燥至稳定重量。根据滤纸前后重量的变化计算累积的生物量。

检测微菌核浓度时,首先将培养液稀释到适宜 MS 计数为度,然后取 100 μL 培养液于玻璃载玻片上,盖上盖玻片。显微计数玻片上所有的 MS。只有直径超过 50 μm,独立的聚集菌丝体才计为 MS。在培养液稀释和取样时,持续摇晃以确保均匀。

检测孢子浓度时,首先将培养液稀释到适宜孢子计数为度。然后取 100 μL 培养液于血球计数板上,盖上盖玻片。五点取样计算孢子数。

1.6 MS 的收集和干燥

白僵菌培养 8 d 后,向培养液中加入硅藻土(DE),使浓度达到 5 g DE/ 100 mL 培养液。用循环水真空泵(SHZ-Ⅲ,上海亚荣生化仪器厂)将 MS-DE 混合物抽滤到预称重的 Whatman No. 54 号滤纸上。将 MS-DE 混合物从滤纸上分离下来,用冷冻干燥机(LGJ-10D,北京四环仪器厂科学仪器有限公司)真空干燥至含水量 <5% 时,用封口机(上海鼎利轻工机械制造有限公司)包装于铝箔袋中,并于 4℃贮存。

1.7 MS 复水后菌丝和孢子检测

将 25 μg 干燥的 MS-DE 撒到 1% 琼脂培养基上。每处理用 2 个水洋菜培养基。在 25℃ 下培养 24 h 后,用体视显微镜每个平板上检查 100 个 MS-DE 颗粒的菌丝萌发情况。琼脂平板在 25℃ 下持续培养 8 d。每个平板加 5 mL 无菌水反复冲洗,用无菌环将孢子从 MS-DE 颗粒上抖落,用移液器吸取每个平板上的所有液体,统计液体体积。用血球计数板显微检测液体中孢子的浓度,统计每个平板上的孢子总数。为了确定每克 MS-DE 所产生的孢子数,用每个平板收获的孢子数除以加到每个水洋菜平板上的干燥 MS-DE 的重量(0.025 g)。

1.8 生测效率的检测

将蛭石(北京市丰台区新发地鸿华园艺场)、粘壤土(从中国农业科学院植物保护研究所温室收集)和营养土(中性花土,吉林省德惠市芳洁花土厂)按 2∶1∶1 的比例混合。参考 Jackson 和 Jaronski(2009)的方法,将 MS-DE 颗粒均匀加入到混配的土壤中,混合比率为 100 μg/ 100 g 土。将上述混合物装入塑料花盆(直径 12.5 cm,高 11 cm)中,并均匀喷洒无离子水,直到盆底有水份渗出为止。将花盆放入塑料托盘中,经常加水保持托盘中持续有水,并能被虹吸到塑料盆中。对照土壤同样处理,但不加入 MS-DE 颗粒。

菌核混合到土壤中 7 d(以充分产孢)后,参考 Ansari 等(2008)的方法,用细毛刷将 30 头 L2 蓟马幼虫转移到一小段豆荚上(作为食物),豆荚放到上述装盆土壤的表面。盆上扣透明的两端开放的圆筒形塑料容器(直径 11 cm,高 18 cm),塑料容器上端罩有防蓟马尼龙纱(120 目)。在塑料容器内壁上端加有一块 5 cm × 4 cm 的黄色粘虫板以诱捕羽化的成虫。罩有塑料容器的塑料盆放在生长箱中培养,培养条件设置同上。每个处理重复 5 次,整个实验重复 2 次。

接入 L2 幼虫 4 d 后,蓟马成虫开始羽化,并粘到塑料容器内的粘虫板上,或者在土壤表面,或者

在塑料容器的内边,每天用放大镜观察成虫羽化,连续 7 d 直到再也没有蓟马成虫出现。从土壤表面或塑料容器内边收集到的蛹和成虫都放到粘虫板上,连同诱到成虫的粘虫板一起放在衬有湿滤纸的培养皿中培养(25℃)以检测它们是否是被白僵菌侵染致死。统计被真菌感染致死的僵虫和健康成虫。

1.9　统计分析

用对照的土壤中羽化出的成虫数减去处理的土壤中得到的羽化成虫数,得到蓟马累积死亡数。所得的死亡率进行正弦转换。培养液中生物量,芽孢和 MS 产量,干燥的 MS-DE 颗粒的分生孢子产量以及蓟马死亡率的平均数均采用单一变量方差分析——最小显著差测验(SPSS 10.0,One—Way ANOVA:LSD tests)。

2　结果与分析

2.1　氮源对白僵菌微菌核、芽孢和生物量的影响

最初的发酵实验表明(表 1),在固定基础盐、复合维生素 B、微量元素、碳源和 0.4% 的吐温 - 80 不变时,接入白僵菌孢子悬浮液培养 5 d 后,只有以大豆粉和玉米粉作为氮源的培养液,能观察到边缘光滑,发育良好的菌核,且两者间数量存在显著性差异($P < 0.05$);以酪氨酸和酵母浸膏作为氮源的培养液,与以大豆粉和玉米粉作氮源的培养液相比,形成显著多的芽孢($P < 0.05$),但并未观察到菌核;以麦麸作为氮源的培养液中不仅没有观察到微菌核,而且生成的菌丝段或芽生孢子以及生物量的累积都显著少于添加其它 4 种氮源的培养液($P < 0.05$)。根据培养液中微菌核的生成情况,以下的实验中只考虑以大豆粉和玉米粉作为氮源的培养液。

表 1　氮源对白僵菌生物量、芽孢和微菌核产量的影响

Table 1　Effects of various nitrogen sources on biomass, blastospore, and MS yields of *Beauveria bassiana* in submerged culture

菌株 Strain	项目 Item	大豆粉 Soybean powder	玉米粉 Corn flour	酪氨酸 Casamino acids	酵母浸膏 Yeast extract	麦麸 Wheat bran
RSB	微菌核数(10^2/mL) Number of microsclerotia	2.5 ± 0.7 b	6.5 ± 1.4 c	0 a	0 a	0 a
	芽孢数(10^5/mL) Number of blastospore	14.8 ± 0.6 b	6.2 ± 0.8 b	1 152 ± 74 c	1 340 ± 48 c	0.07 ± 0.006 a
	生物量(g/L) Biomass	3.56 ± 0.8 b	2.93 ± 1.2 b	3.99 ± 1.5 b	3.17 ± 1.2 b	0.014 ± 0.002 a
SZ21	微菌核数(10^2/mL) Number of Microsclerotia	2.2 ± 1.7 b	6.3 ± 2.1 b	0 a	0 a	0 a
	芽孢数(10^5/mL) Number of blastospore	17.9 ± 2.4 b	7.4 ± 2.7 b	1 472 ± 64 c	1 383 ± 92 c	0.15 ± 0.04 a
	生物量(g/L) biomass	3.74 ± 1.3 b	3.01 ± 0.9 b	4.12 ± 1.7 b	3.57 ± 1.4 b	0.022 ± 0.007 a

注:同行不同字母表示在 0.05 水平差异显著($P < 0.05$)。下表同。

Data with different letters in the same row indicate significantly different at 0.05 level. The same below.

2.2　白僵菌微菌核生成模式

在以玉米粉为氮源,含有 0.4% 的吐温 - 80 的培养液中,接种白僵菌 RSB 菌株孢子悬浮液后培养物的形成遵循这样一个模式(图 1):分生孢子在 24 h 内萌发形成匀质的菌丝,第 2 天,菌丝密度增加。又经过 2 d 的生长后,菌丝开始聚集形成菌核,最后到第 6 天时,形成边缘光滑的菌核。形成的白僵菌微菌核大小不同,直径范围为 50 ~ 300 μm。

2.3　吐温 -80 对白僵菌微菌核和芽孢产量的影响

在以玉米粉为氮源的培养液中添加不同含量的吐温 - 80 对白僵菌的微菌核和芽孢的形成具有显著影响(表 2)。培养液中吐温 - 80 含量在 0.4% ~ 0.8% 时,能形成发育良好、大小均匀(直径 50 ~ 300 μm)的微菌核;当培养液中吐温 - 80

的含量≤0.2%时，除了形成直径 50 ~ 300 μm 的微菌核外，还形成一些较大的微菌核(500 ~ 1 000 μm)，并且微菌核数量显著下降($P < 0.05$)；当培养液中吐温 -80 的含量为 1.0% ~ 1.2%时，菌丝段或芽孢数量显著增多($P < 0.05$)，但观察不到微菌核的形成。

表 2 吐温 -80 对白僵菌微菌核产量、微菌核体积和芽孢产量的影响

Table 2 Effects of Tween 80 on MS sizes, MS and blastospore yields of *Beauveria bassiana* in submerged culture

菌株 Strain	项目 Item	吐温 80 含量(Concentration of Tween 80)(%)						
		0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
RSB	微菌核数(10^2/mL) Number of microsclerotia	0.9 ± 0.4 b	1.7 ± 0.6 b	6.5 ± 1.4 c	5.8 c	6.2 c	0 a	0 a
	微菌核体积(μm) Size of microsclerotia	50 ~ 1 000	50 ~ 1 000	50 ~ 300	50 ~ 300	50 ~ 300	—	—
	芽孢数(10^5/mL) Number of blastospore	5.2 ± 1.4 b	4.8 ± 0.7 c	6.2 ± 0.8 b	5.5 ± 1.7 b	5.7 ± 1.1 b	77.4 ± 0.2 a	83.6 ± 0.6 a
SZ21	微菌核数(10^2/mL) Number of microsclerotia	1.1 ± 0.3 b	1.2 ± 0.5 b	6.3 ± 2.1 c	6.4 ± 1.6 c	6.0 ± 0.8 c	0 a	0 a
	微菌核体积(μm) Size of microsclerotia	50 ~ 1 000	50 ~ 1 000	50 ~ 300	50 ~ 300	50 ~ 300	—	—
	芽孢数(10^5/mL) Number of blastospore	5.1 ± 1.2 c	5.0 ± 0.8 c	7.4 ± 2.7 b	5.5 ± 1.4 c	6.3 ± 1.5 bc	108.1 ± 2.3 a	96.7 ± 4.2 a

2.4 氮源对白僵菌 MS - DE 颗粒复水后菌丝萌发和孢子产生的影响

所有测试的白僵菌菌株培养并制备的 MS - DE 颗粒经复水后都能萌发出菌丝和孢子。但是不同菌株和培养液中的不同氮源对产生的分生孢子量有着显著影响($P < 0.05$)(表3)。无论是 RSB 还是 SZ21 菌株，以大豆粉为氮源的培养液培养出的微菌核经干燥制备再复水后萌发的分生孢子数均高于以玉米粉为氮源的培养液培养出的微菌核，但未达到显著水平($P > 0.05$)。而无论是以大豆粉还是以玉米粉为氮源，SZ21 菌株的微菌核经干燥制备再复水后萌发的分生孢子数显著高于 RSB 菌株($P < 0.05$)。

表 3 白僵菌 MS-DE 颗粒复水后萌发菌丝和产孢情况

Table 3 Germination of hyphal and conidia of MS-DE preparations of *Beauveria bassiana*

菌株 Strain	氮源 Nitrogen source	菌丝萌发率(%) Rate of hyphal germination	孢子产量(10^7/g 干燥 MS-DE) Sporogenic germination (10^7/g dried MS-DE)
RSB	大豆粉 Soybean powder	100	26.8 ± 4.5 b
	玉米粉 Corn flour	100	22.4 ± 3.9 b
SZ21	大豆粉 Soybean powder	100	73.8 ± 10.3 a
	玉米粉 Corn flour	100	67.9 ± 7.3 a

2.5 白僵菌 MS-DE 颗粒对西花蓟马土栖阶段的防效

从表 4 可以看出，与未处理对照相比，无论是大豆粉还是玉米粉作氮源培养出的白僵菌微菌核

表 4 用白僵菌微菌核处理的土壤中西花蓟马土栖阶段的校正死亡率(平均数 ± 标准误)

Table 4 Mortality of soil-dwelling of *Frankliniella occidentalis* in soil treated with *Beauveria bassiana* MS (mean ± *SE*)

微菌核处理 Treated with MS			
RSB 菌株 Strain RSB		SZ21 菌株 Strain SZ21	
大豆粉 Soybean powder	玉米粉 Corn flour	大豆粉 Soybean powder	玉米粉 Corn flour
89.2 ± 4.7 a	83.5 ± 5.9 a	84.7 ± 6.3 a	81.1 ± 4.6 a

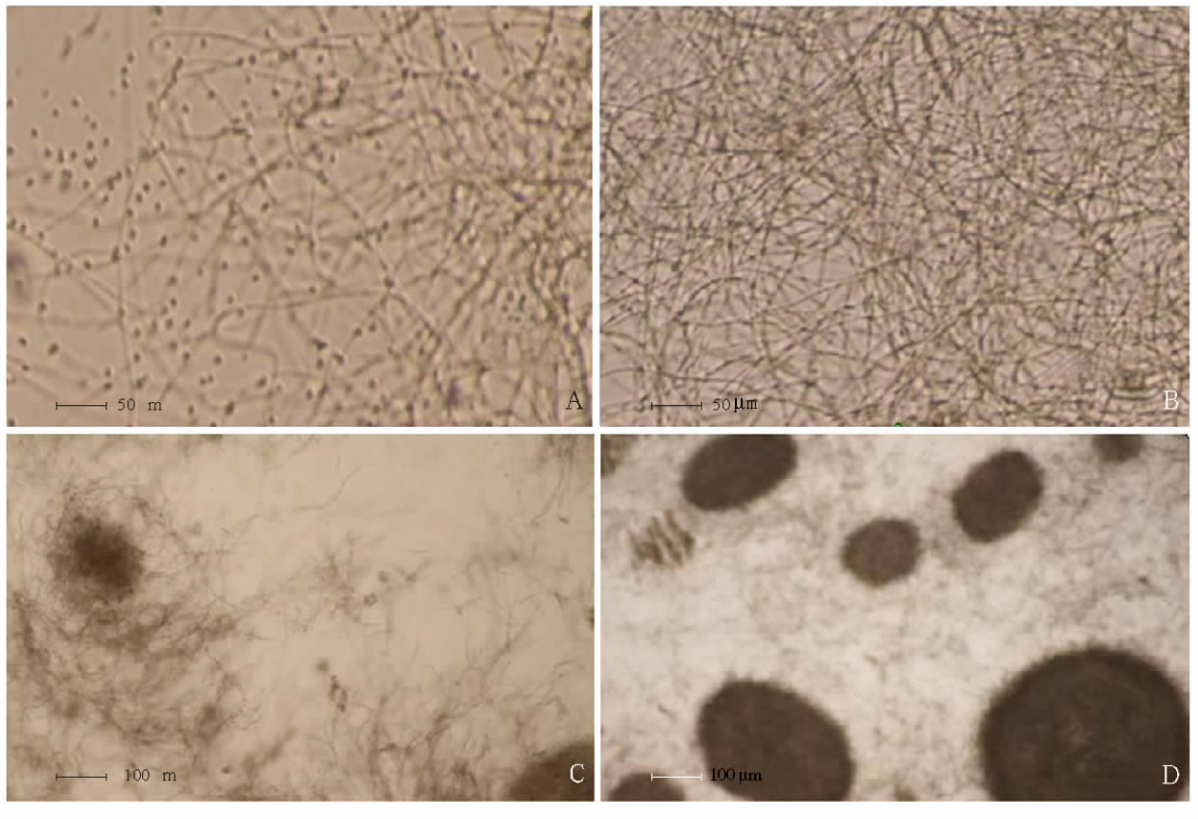


图 1　在摇床上液体深层培养时白僵菌菌核的发育

Fig. 1　Development of sclerotia in aerated liquid cultures of *Beauveria* bassiana grown in a rotary shaker incubator

(A)24 h 后接入的分生孢子开始形成匀质的菌丝,随着培养时间的增加,菌丝开始聚集形成菌核;(B) 第 2 天;(C) 第 4 天;(D) 第 6 天。

Conidial inocula germinated to produce a homogenous hyphal mass (A) after 24 h growth. As cultures aged, hyphae aggregated to form sclerotial bodies; (B) Day 2; (C) Day 4; (D) Day 6.

预混到土壤中都能够显著提高西花蓟马土栖阶段的死亡率($P < 0.05$)。在同样的氮源条件下,白僵菌菌株 RSB 微培养出的微菌核比菌株 SZ21 能引起西花蓟马土栖阶段更高的死亡率,但是二者没有显著差异($P < 0.05$)。

3　讨论

包括白僵菌在内的昆虫病原真菌的高致病力菌株被多次应用于西花蓟马的综合治理中。然而,目前对这些真菌病原物作用靶标的研究主要集中在植物冠层中的蓟马成虫和幼虫上(Jacobson *et al.*, 2001; Maniania *et al.*, 2001; Ludwig and Oetting, 2002; Ship *et al.*, 2003; Ugine *et al.*, 2005; Al-mazra'awi *et al.*, 2006),而对于防治其土栖阶段的预蛹和蛹的研究还只有为数不多的尝试(Ansari *et al.*, 2007; 2008)。考虑到西花蓟马在土中渡过的时间,对其土栖阶段的生防应该是对该虫进行综合治理的一个重要环节。对昆虫病原真菌而言,当其被施用到土壤中时,避免了紫外线辐射(Inglis *et al.*, 1997)和被雨水冲走(Inglis *et al.*, 1995)的不利影响。此外,土中的温度是温和的,土壤湿度也更利于真菌的生长。因此,选择土栖昆虫种类(或发育阶段)作为昆虫病原真菌的防治目标比那些在地上部植株上取食的昆虫种类(或发育阶段)更有利。

以前许多研究都分析并讨论了白僵菌分生孢子,芽孢和菌丝的液体深层培养。在本研究中,作者描述了白僵菌微菌核的液体培养。微菌核,作为密集的菌丝聚集体是许多植物病原真菌的越冬结构,存在于土壤和腐烂的植物组织中,并经常作为下一季敏感作物幼苗的侵染源。Jackson 和 Schisler(1995)以及 Shearer 和 Jackson(2006)首先

报道了植物病原真菌(*Colletotrichum truncatum*)和(*Mycoleptodiscus terrestris*)的微菌核能在液体深层培养中产生。随后 Jackson 和 Jaronski(2009)又报道了昆虫病原真菌绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)微菌核的液体培养。本研究中采用以前报道的液体介质成分(Jackson and Schisler,1995; Shearer and Jackson, 2006;Jackson and Jaronski, 2009)来培养时,白僵菌并不产生微菌核,直到添加了一定量的吐温 -80,并采用了不同于培养 *C. truncatum*(Jackson and Schisler, 1995)和绿僵菌(Jackson and Jaronski,2009)的氮源。说明不同种类的真菌产生菌核所需的条件是有所区别的。此外,本研究还发现,在培养液中含有一定浓度的吐温 -80(0.4% ~0.8%)时,培养 6 d 后白僵菌开始大量形成菌核,产生少量孢子;当培养液中吐温 -80 浓度≤0.2% 时,没有菌核生成,而此时孢子大量产生。说明诱导孢子产生的环境条件抑制菌核的发育,诱导菌核形成的环境条件反过来也抑制孢子的发育。这一结果与 Coley-smith 和 Cooke (1971)对 *Botrytis* 的研究结论相一致。

在以前的研究中,Gindin 等(1996)筛选了包括白僵菌在内的 4 个种 16 个菌株的虫生真菌对西花蓟马等害虫的毒力。所有测试的菌株能引起西花蓟马 58.2% ~89.5% 的死亡率。Jacobson 等(2001)测试了 2 种商用白僵菌制剂 Naturalis-L (Troy BioSciences Inc., USA) and BotaniGard WP (Mycotech, Butte, MT, USA),防治温室黄瓜上的西花蓟马。与未处理对照相比,2 种产品都能使西花蓟马的未成熟期数量降低 87% 和 75%。本实验中两株测试用白僵菌菌株(RSB,SZ21)都能引起超过 81% 的蓟马死亡。说明通过在土壤中预混白僵菌 MS 的方法能够使入土化蛹的蓟马在土壤中获得足够多的分生孢子而被侵染。

在本实验中,最终只有很少的蓟马从各种菌核处理的土壤中羽化出来,而且有近一半的个体最终长出了菌丝和孢子。很可能是由于这些成虫羽化后从土壤中爬出时接触到了侵染源。但有一些个体从羽化到长出菌丝和孢子时间间隔较短,这可能是由于在预蛹或蛹期就已经接触到了侵染源,但是致死是与剂量有关的(Butt *et al.*,1994),如果只接触了较少的孢子,就需要较长的时间去发展,并在成虫期才表现出来,直至长出菌丝。

本研究证明了用液体深层发酵法能产生白僵菌微菌核。干燥制备的微菌核能够保持活力,复水后能够萌发出菌丝和孢子,增加了白僵菌作为西花蓟马土栖阶段生防因子的潜力。目前正在进行其它方面的研究以优化该菌的成功生产和稳定,以及防治西花蓟马土栖阶段的田间实验。

参考文献(References)

Al-mazra' awi MS, Shipp L, Broadbent B, Kevan P, 2006. Biological control of *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae) and *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) by *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae) vectored *Beauveria bassiana* in greenhouse sweet pepper. *Biological Control*, 37: 89—97.

Ansari MA, Brownbridge M, Shah FA, Butt TM, 2008. Efficacy of entomopathogenic fungi against soil-dwelling life stages of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, in plant-growing media. *Entomol. Exp. Appl.*, 127:80—87.

Ansari MA, Shah FA, Whittaker M, Prasad M, Butt TM, 2007. Control of western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*) pupae with *Metarhizium anisopliae* in peat and peat alternative growing media. *Biological Control*, 40: 293—297.

Berndt O, Meyhfer R, Poehling H. 2004. The edaphic phase in the ontogenesis of *Frankliniella occidentalis* and comparison of *Hypoaspis miles* and *Hypoaspis aculeifer* as predators of soil-dwelling thrips stages. *Biological Control*, 30: 17—24.

Boyette CD, Jackson MA, Bryson CT, Hoagland RE, Connick Jr WJ, Daigle DJ, 2007. Sesbania exaltata biocontrol with *Colletotrichum truncatum* microsclerotia formulated in 'Pesta' granules. *Bio-Control*, 52: 413—426.

Brownbridge M, Adamowicz A, Skinner M, Parker BL, 1999. Prevalence of fungal entomopathogens in the life cycle of pear *Thrips taeniothrips* inconsequens (Thysanoptera: Thripidae) in vermont sugar maple forests. *Biologlcal Control*,16: 54—59.

Butt TM, Ibrahim L, Ball BV, Clark SJ, 1994. Pathogenicity of the entomogenous, hyphomycete fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against crucifer pests and the honey bee. *Biocontrol Science and Technology*, 4: 207—214.

Coley-smith JR, Cooke RC, 1971. Survival and germination of fungal sclerotia. *Annual Review of Phytopathology*, 9:65—92.

Copping LG, Menn JJ,2000. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science*,

56: 651—676.

Gindin G, Barash I, Raccah B, Singer S, Ben-Ze' ev IS, Klein M, 1996. The potential of some entomopathogenic fungi as biocontrol agents against the onion thrips, *Thrips tabaci* and the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Folia Entomologica Hungarica*, 57 (Suppl.): 37—42.

Herron GA, James TM, 2005. Monitoring insecticide in Australian *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae) detects fipronil and spinosad resistance. *Australian J. Entomol.*, 44: 299—303.

Inglis GD, Johnson DL, Goettel MS, 1995. Effects of simulated rain on the persistence of *Beauveria bassiana* conidia on leaves of alfalfa and wheat. *Biocontrol Science and Technology*, 5: 365—369.

Inglis GD, Johnson DL, Gottel MS, 1997. Effects of temperature and sunlight on mycosis (*Beauveria bassiana*) (Hyphomycetes : Sympodulosporae) of grasshoppers under field conditions. *Environmental Entomology*, 26:400—409.

Jackson MA, Jaronski ST, 2009. Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. *Mycological Research*, 113: 842—850

Jackson MA, Schisler AD, 1995. Liquid culture production of microsclerotia of *Colletotrichum truncatum* for use as bioherbicidal propagules. *Mycol. Res.*, 99 (7): 879—884.

Jacobson RJ, Chandler D, Fenlon J, Russell KM, 2001. Compatibility of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin with *Amblyseius cucumeris* Oudemans (Acarina: Phytoseiidae) to control *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae) on cucumber plants. *Biocontrol Science and Technology*, 11(3): 391—400.

Jensen SE, 2000. Insecticides resistance in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Intergrated Pest Manag. Rev.*, 5: 131—146.

Kirk WDJ, Terry LI, 2003. The spread of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande.) *Agric. Forest Entomol.*, 5:301—310.

Liang XH, Lei ZR, Wen JZ, Zhu ML, 2010. The diurnal flight activity and influential factors of *Frankliniella occidentalis* in the greenhouse. *Insect Science*, 17: 534—541.

Ludwig SW, Oetting RD. 2002. Efficacy of *Beauveria bassiana* plus insect attractants for enhanced control of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *Fla. Entomologist*, 85 (1): 270—272.

Maniania NK, Ekesi1S, Löhr B, Mwangi F. 2001. Prospects for biological control of the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, with the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*, on chrysanthemum. *Mycopathologia*, 155: 229—235.

Nagata T, Peters D, 2001. An anatomical perspective of tospovirus transmission//Harris KF, Smith OP, Duffus JE (eds.). Virus-insect-plant Interactions. Academic Press, San Diego CA. 51—67.

Shearer JF, Jackson MA, 2003. Mycoherbicidal Compositions and Methods of Preparing and Using the Same. United States Patent #6,569,807.

Shearer JF, Jackson MA, 2006. Liquid culturing of microsclerotia of Mycoleptodiscus terrestris, a potential biological control agent for the management of Hydrilla. *Biological Control*, 38:298—306.

Shipp JL, Zhang Y, Hunt DWA, Ferguson G, 2003. Influence of humidity and greenhouse microclimate on the efficacy of *Beauveria bassiana* (Balsamo) for control of greenhouse arthropod pests. *Environmental Entomology*, 32: 1154—1163.

Ugine TA, Wraight SP, Sanderson JP, 2005. Acquisition of lethal doses of *Beauveria bassiana* conidia by western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, exposed to foliar spray residues of formulated and unformulated conidia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 90: 10—23.

Ullman DE, Meideros R, Campbell LR, Whitfield AE, Sherwood JE, German TL, 2002. Thrips as vectors of tospoviruse. *Adv. Bot. Res.*, 36:113—140

张素华,雷仲仁,范淑英,问锦曾, 2009. **不同温度下 4 株自僵菌对西花蓟马的致病力**. **植物保护**, 35(6):64—67.