感染水椰八角铁甲的绿僵菌的分子鉴定及致病力测定*

徐 利[1] 蓝江林[2] 侯有明[1**] 陈玉森[1] 陈智雄[1] 翁章权[1]

(1. 农业部亚热带农业生物灾害与治理重点开放实验室 福建农林大学植物保护学院 福州 350002;
2. 福建省农科院农业生物资源研究所 福州 350003)

摘 要 在室内饲养的水椰八角铁甲 *Octodonta nipae*(Maulik)种群中,发现有大量甲虫被病原菌感染致死。对死虫体表的病原真菌进行分离鉴定,并依据 ITS 序列分析鉴定,确定该病原真菌为金龟子绿僵菌小孢变种(*Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*)。经室内致病力测定,接种浓度分别为 $1.0\times10^5\sim1.0\times10^{10}$ cfu·mL^{-1}孢子悬浮液,在接菌后 10 d,成虫致病力方程为 $y=-4.992+5.623x$,LC_{50}对数剂量为 7.721;幼虫致病力方程为 $y=-4.335+5.368x$,LC_{50}对数剂量为 6.420。结果表明金龟子绿僵菌小孢变种对水椰八角铁甲幼虫和成虫具有高的致病力,且浓度越高感染率越高,相同浓度条件下幼虫的感染率较成虫高。金龟子绿僵菌小孢变种在水椰八角铁甲生物防治中具有较强的应用潜力。

关键词 水椰八角铁甲,金龟子绿僵菌小孢变种,ITS 序列分析,致病力测定

Molecular identification and pathogenicity assay on *Metarhizium* against *Octodonta nipae* (Coleoptera: Chrysomelidae)

XU Li[1] LAN Jiang-Lin[2] HOU You-Ming[1**] CHEN Yu-Sen[1]
CHEN Zhi-Xiong[1] WENG Zhang-Quan[1]

(1. Key Laboratory of Subtropical Agro-Biological Disasters and Management, Ministry of Agriculture, People's Republic of China, Department of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;
2. Resource Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China)

Abstract High adult and larval mortality due to infection with a pathogenic fungus was observed when rearing *Octodonta nipae* (Maulik) under laboratory conditions. ITS sequence analysis identified the fungus as *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. The effect of inoculating 3rd instar larvae and adults of *O. nipae* with six different concentrations of *M. anisopliae* var. *anisopliae* was investigated. Dose-response bioassays showed that *M. anisopliae* var. *anisopliae* had a high level of toxicity to both larvae and adults. At concentrations ranging from 1.0×10^5 cfu·mL^{-1} to 1.0×10^{10} cfu·mL^{-1}, the virulence equations on the 10th day after infection were $y=-4.335+5.368x$ and $y=-4.992+5.623x$ for larvae and adults, respectively. The estimated logarithm of median lethal concentration was 6.420 and 7.721 for larvae and adults, respectively. These results indicate that *M. anisopliae* var. *anisopliae* was highly virulent against *O. nipae* larvae and adults and that the degree of virulence increased with increasing concentration. The infection rate was higher in larvae than in adults at the same concentration. These results indicate that *M. anisopliae* var. *anisopliae* could be a potential biological control agent for *O. nipae*.

Key words *Octodonta nipae*, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, ITS sequence analysis, virulent bioassays

水椰八角铁甲 *Octodonta nipae*(Maulik)隶属鞘翅目铁甲科(Coleoptera: Chrysomellidae),是棕榈科植物的重要食叶害虫,原产于马来西亚(孙江华等,2003; Hou and Weng, 2010)。2001 年在我

* 资助项目:科技部"973"项目(2009CB119206)、国家自然科学基金(30871656)。
** 通讯作者,E-mail: ymhou@fjau.edu.cn
收稿日期:2010-08-12,接受日期:2011-04-01

国海南省东方市江南苗圃内的华盛顿棕榈(*Washingtonia robusta* H. Wendl)上首次发现,为此国家质量监督检验检疫总局与国家林业局联合发出了《关于海南省东方市发现水椰八角铁甲的警示通报》(孙江华等,2003; 吴大军等,2007)。2004 年南海检验检疫局人员首次从入境棕榈科植物截获该虫(梁琼超等,2005)。2007 年作者所在研究室在福建局部地区发现该虫猖獗危害,对棕榈科植物造成严重的破坏,致使大量棕榈科植株死亡(Hou and Weng, 2010)。针对水椰八角铁甲的控制,大多是在发生初期使用化学杀虫剂防治,但是由于椰树高大,施药困难,费用高昂,又容易污染环境,损害人类健康,且防效甚微。因此,探寻新的控制技术防控水椰八角铁甲具有重要意义。

据不完全统计,绿僵菌能感染世界上 200 多种昆虫,致病力强,效果好,对人畜和作物无毒害,利用绿僵菌对害虫进行微生物防治具有广阔的前景(王海川和尤民生,1999)。由于绿僵菌的种类较多,对绿僵菌的鉴定不仅需要传统形态学鉴定,更需要从分子水平上加以确认。目前,rDNA 基因是所有已知微生物中累计突变最稳定的,所以 rDNA 序列已被广泛用于分子系统和微生物鉴定(Yang *et al.*, 2009)。White 等(1990)为真菌 rDNA 的 ITS 设计了 3 对特异引物,即 ITS1,ITS4 和 ITS5,可用于大多数担子菌和子囊菌的检测(Smith and Read,1997),通过测定菌株的 ITS 序列来判菌株的分类地位。本研究室在水椰八角铁甲室内种群饲养过程中,发现大多成虫和幼虫在自然状态下被绿僵菌感染,而目前国内外尚未有绿僵菌防治水椰八角铁甲的报道。因此,本文利用形态学和分子生物学的方法鉴定该菌的种类,并在室内测定其控害能力,为水椰八角铁甲的生物防治提供参考。

1　材料与方法

1.1　菌源

从室内被感染的水椰八角铁甲成虫形成的僵虫上挑取菌株,采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)纯化培养,保存于 4℃ 备用。

1.2　虫源

在室内人工培养箱中,温度(25 ± 1)℃,RH(85 ± 5)%,L∶D = 12∶12 的条件下,用银海枣(*Phoenix sylvestris* (L.) Roxb.)心叶饲养水椰八角铁甲种群,分别挑选健康的、大小和龄期一致的成虫和幼虫进行试验。

1.3　病原菌的分离与形态特征

先将水椰八角铁甲僵虫用 75% 酒精处理 2 s,再用 0.1% 升汞处理 2 ~ 3 min 后,用无菌水清洗 3 遍,用已消毒的挑针挑取僵虫上菌株置 PDA 上培养。将平板放置于 25℃ 恒温培养箱中培养 3 ~ 5 d。测定菌落直径,从这些菌落中挑取少量菌丝体,制做玻片观察,并在卡尔蔡司显微镜系统(Stemi 2000c)下对病原菌的产孢细胞的类型; 分生孢子形状、大小和着生方式; 分生孢子梗的类型、大小等进行观察和显微照相,采用 Auto-Montage Pro 软件测定各形态指标,测定时各选择 30 个特征菌落、分生孢子进行测定,按以上各形态特征和指标平均值对菌种进行初步鉴定。

1.4　病原菌的分子鉴定

1.4.1　rDNA-ITS 区扩增　采用 CTAB 法提取菌株 DNA,引物设计合成参考杨红等(2002)方法,正向引物(P1): 5′-CTTGCGTTGATTACGTCCC-3′,反向引物(ITS4): 5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′。PCR 反应的总体积为 25 μL,含有 1 个单位的 Taq 酶、10 × buffer 2.5 μL、dNTP 0.2 μL、10 μmol · L^{-1} 的正向引物和反向引物各 1 μL、DNA 模板 25 ng。PCR 扩增程序: 94℃ 预变性 10 min,94℃ 变性 1 min,55℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 2 min,共 25 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳,切胶回收。

1.4.2　PCR 产物的直接比对分析测序　将回收的目的片断送交上海生工生物工程技术服务有限公司进行侧列。序列结果通过国际互联网(http://www.ncbi.nlm.nih.gov)进行核酸同源性检索,检索程序主要采用 Blast,即核酸序列对核酸序列数据库的检索。

1.5　病原菌的致病力测定

分别测定病原菌对幼虫和成虫的致病力,供试幼虫选择蜕皮 2 日内的 3 龄幼虫,成虫选取羽化 5 ~ 15 日龄,大小一致的健康成虫作为供试虫。每组 30 头成虫或幼虫。用 0.05% Tween - 80 无菌水配制不同浓度的分生孢子悬液,即: 1.0×10^5、1.0×10^6、1.0×10^7、1.0×10^8、1.0×10^9、1.0

$\times 10^{10}$ cfu · mL^{-1}，以 0.01% Tween－80 无菌水为对照，采用喷雾法对虫体进行接菌。喷雾淋湿后放入直径 20 cm 的培养皿（底部铺一层滤纸）内饲养，用新鲜的银海枣心叶作为饲料，盖上双层潮湿纱布，并经常喷水保持适当的湿度。置于 25℃ 的恒温箱中培养，每 3 天更换一次新鲜心叶，每天观察记录水椰八角铁甲的死亡情况。每个处理重复 3 次。

1.6 数据处理

通过 Clustal W 方法及 MEGA 4.1 软件进行序列分析。致病力测定数据使用 SPSS 17.0 软件的 Probit 方法处理。

2 结果与分析

2.1 虫体感染特征

水椰八角铁甲幼虫被绿僵菌感染后，尾部呈弯钩状；之后虫体稍膨胀，僵化；最后体表上长出白色菌丝体，后期绿色孢子长满全身（图 1）。被绿僵菌感染的成虫最初表现为活动迟缓，食量明显减少，产卵量减少，之后停止活动，在成虫的头部、胸部及腹部节间缝隙等长出白色菌丝体，后期绿色孢子长满全身（图 2）。

图 1 水椰八角铁甲幼虫被绿僵菌感染症状

Fig. 1 The symptoms of *Octodonta nipae* larvae infected with *Metarhizium*

2.2 病原菌的形态特征

病原菌在 PDA 培养基上的菌落近圆形，不透明，中央凸起。菌落初期为白色绒毛状，产孢期中央呈橄榄绿色，边缘为乳白色。随着菌落逐渐向外围扩大，边缘为黄绿色。在 PDA 培养基上生长 4 d 的菌落平均直径约为（22.7 ± 2.2）mm。产孢细胞

图 2 水椰八角铁甲成虫被绿僵菌感染症

Fig. 2 The symptoms of *Octodonta nipae* adults infected with *Metarhizium*

为瓶颈状。分生孢子单生或串生，呈长椭圆形，大小平均为（7.4 ± 0.9）μm × （2.9 ± 0.2）μm。分生孢子梗单生、对生或侧生，大小平均为（9.3 ± 0.7）μm × （2.6 ± 0.1）μm（图 3）。

2.3 病原菌的分子鉴定

利用引物 P1/ ITS4 对供试菌株的 rDNA-ITS 区进行扩增，扩增图谱见图 4。从图 4 可见，供试菌株扩增出单一条带，大小为 500 ~ 600 bp 左右。序列已登录 GenBank，序列号为 GU909512。序列结果通过国际互联网（http://www.ncbi.nlm.nih.gov）用 Blast 进行同源性搜索，得到的同源序列是绿僵菌属物种。从 GenBank 中查寻到的绿僵菌属中部分种及亚种的 rDNA-ITS 序列共同比对，包括黄绿绿僵菌大孢变种（*M. flavoviride* var. *flavoviride*，AF138270）、黄绿绿僵菌小孢变种（*M. flavoviride* var. *minus*，AF138272）、黄绿绿僵菌新西兰变种（*M. flavoviride* var. *novazea landicum*，AF139853）、金龟子绿僵菌小孢变种（*M. anisopliae* var. *anisopliae*，AF135210）、金龟子绿僵菌大孢变种（*M. anisopliae* var. *majus*，AF137061）、金龟子绿僵菌鳞鳃金龟变种（*M. anisopliae* var. *lepidiotum*，AF137065）和白色绿僵菌（*M. album*，AF137067），并以球孢白僵菌（*Beauveria bassiana*（Balsamo）*Vuillemin*）为外群，结合本实验的相应序列，利用 Clustal W 软件将序列匹配排列，用 DNAMAN version 5.2.2.0 软件进行同源性比较，构建分子系统发育树（图 5）。

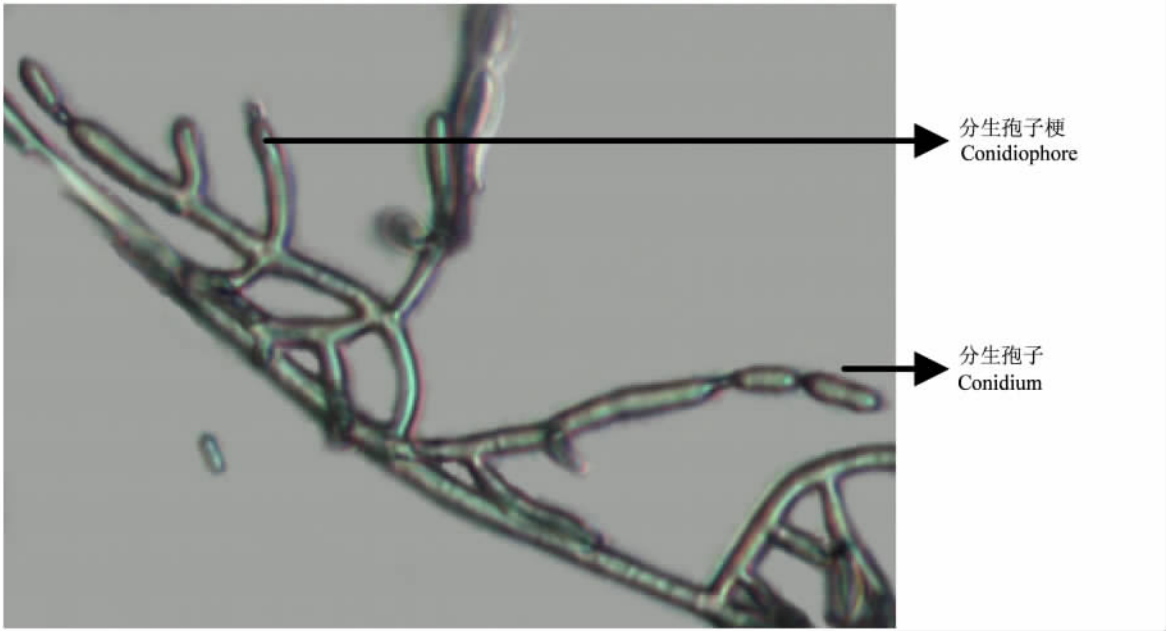

图 3　菌株的分生孢子梗和分生孢子形态(400 ×)

Fig. 3　The conidia and conidiophores of the strain (400 ×)

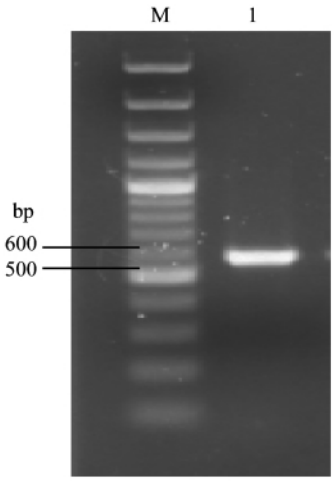

图 4　菌株的 rDNA-ITS 区段 PCR 扩增凝胶电泳图(M: mark; 1: 供试菌株)

Fig. 4　The electrophoresis of ITS PCR for the strain (M: mark; 1: tested strain)

用 PSR(phylogenetic species recognition) 作为鉴定真菌种的标准,并根据丝状真菌分子分类原则: 即对菌株的 ITS 区域比对,丝状真菌在种间、种内遗传距离上有差异,序列相似性不低于 99%,鉴别为相同种。因此无论从形态学,还是从分子角度,可以判定供试菌株应为绿僵菌小孢变种(*Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*),该结果与形态鉴定结果相一致。

2.4　致病力测定

从图 6、图 7 和表 1 可以看出,处理 2 d 后幼虫有少数死亡,成虫从第 3 天开始死亡。绿僵菌小孢变种对水椰八角铁甲成虫和幼虫的室内致病力都随着孢子浓度($10^5 \sim 10^{10}$ cfu · mL^{-1})的增加呈上升趋势。处理 10 d 后,成虫的累积校正死亡率分别为 16.7%、22.28%、43.3%、52.2%、64.4% 和 74.4%,致病力方程为 $y = -4.992 + 5.623x$,LC_{50} 对数剂量为 7.721; 幼虫的累积校正死亡率分别为 30.3%、42.7%、52.8%、67.4%、78.7% 和 87.6%,致病力方程为 $y = -4.335 + 5.368x$,LC_{50} 对数剂量为 6.420。

3　讨论

在鉴定某些病原菌时,从形态学角度难以确定的种,可以通过测定菌株的 ITS 序列来确定。周权等(2005) 对绿僵菌 ACCC30104 菌株的分子鉴定实验也证明了这一点。以水椰八角铁甲为寄主的绿僵菌种类尚未见报道,本实验利用 ITS4 引物鉴定出该菌株为金龟子绿僵菌小孢变种,序列已登录 GenBank,得到序列号为 GU909512。

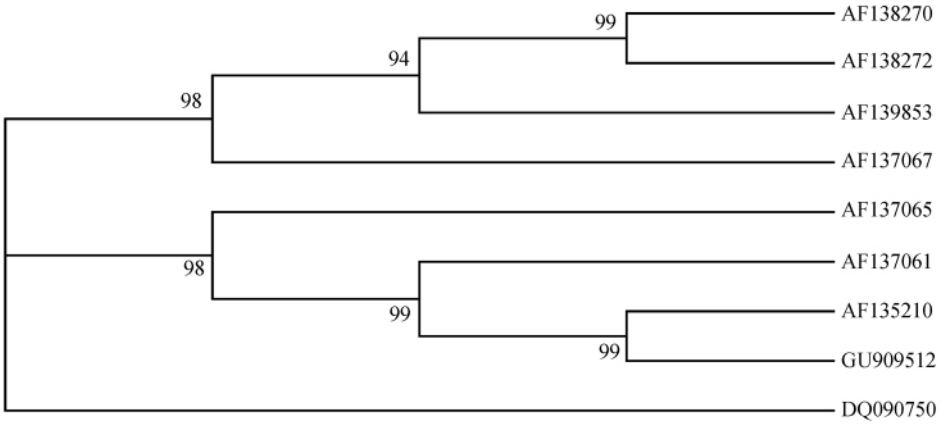

图 5 绿僵菌属部分种的 rDNA-ITS 序列分支系统树(树枝上端数值为自展数据支持率%)

Fig. 5 Neighbour-joining tree based on rDNA-ITS sequence data from *Metarhizium* spp.

(Numerical values above the branches indicate bootstrap percentiles from replicates)

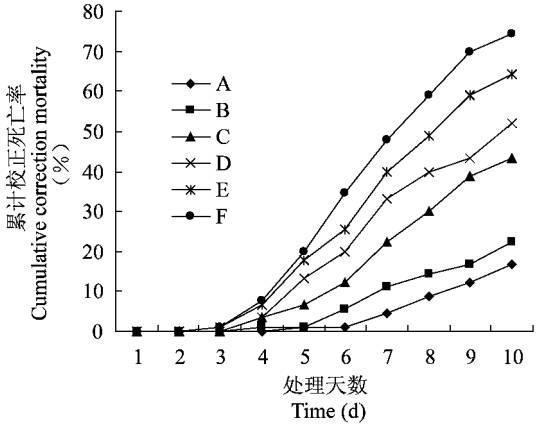

图 6 水椰八角铁甲成虫感染绿僵菌后的累积校正死亡率

Fig. 6 The cumulative correction mortality of *Octodonta nipae* adults treatment with *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*

Concentration (cfu · mL^{-1}): A: 1.0×10^5; B: 1.0×10^6; C: 1.0×10^7; D: 1.0×10^8; E: 1.0×10^9; F: 1.0×10^{10}

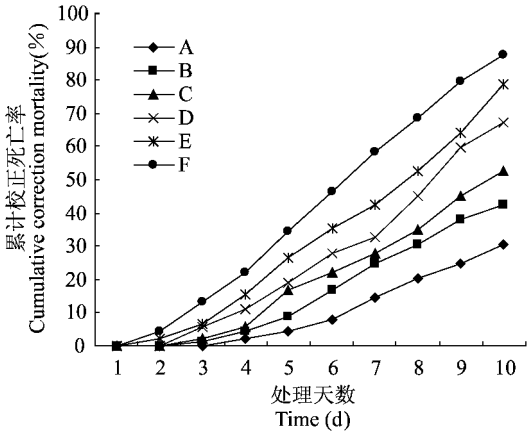

图 7 水椰八角铁甲幼虫感染绿僵菌后的累积校正死亡率

Fig. 7 The cumulative correction mortality of *Octodonta nipae* larvae treatment with *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*

Concentration(cfu · mL^{-1}): A: 1.0×10^5; B: 1.0×10^6; C: 1.0×10^7; D: 1.0×10^8; E: 1.0×10^9; F: 1.0×10^{10}

表 1 绿僵菌对水椰八角铁甲成虫和幼虫处理 10 d 后的室内致病力测定结果

Table 1 Virulence determination of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* against *Octodonta nipae* adult and larva after 10 days

虫态 Stage	致病力回归方程 Pathogenicity regression equation	LC_{50}(95%置信限) Logarithm of median lethal concentration (95% confidence limits)	相关系数(r) Correlation coefficient	卡方值(χ^2) Chi-square(χ^2)
成虫(Adult)	$y = -4.992 + 5.623x$	7.721(7.119—8.467)	0.990	0.580
幼虫(Larva)	$y = -4.335 + 5.368x$	6.420(5.708—6.986)	0.989	0.652

注:卡方值均小于 $\chi^2(4,0.05) = 9.49$,故毒力回归方程与实际相符。

$\chi^2 < \chi^2(4,0.05) = 9.49$ shows that toxicity regress equation is practical.

目前,绿僵菌的研究和应用已成为生物防治领域的热门话题。金龟子绿僵菌小孢变种作为一类重要的昆虫病原真菌,生产过程简单,使用持效期长、致病力强,使用后无残留、对非靶标生物安全等优点。在国外已有许多国家开发生产金龟子绿僵菌商品制剂并被大面积推广应用。金龟子绿僵菌可用于农作物、森林、卫生等害虫的防治。近年来应用该菌防治草原蝗虫(张泽华等,2000)、椰心叶甲(丁福章等,2006)、菜青虫(顾勇和张舒,2007)等均取得良好效果,对森林重要害虫马尾松毛虫也有较好的致病性(宋漳等,2002)。金龟子绿僵菌小孢变种可以感染水椰八角铁甲在国内尚属首次报道,本研究发现该病原真菌对水椰八角铁甲具有致死作用。实验结果表明,金龟子绿僵菌小孢变种对水椰八角铁甲成虫和幼虫均有明显的致病力,且随菌液处理浓度的增加致病力逐渐增强,对幼虫的处理效果较成虫明显,因此具有很好的生防潜能。据常金梅等(2010)报道,温度、pH 值、紫外线以及常用杀虫剂都是影响绿僵菌致病力的因子。考虑到田间寄主植物较高大,心叶生长于植株最顶端,紫外线可能对孢子有杀伤作用,因此,绿僵菌的田间施用剂型与方法还有待进一步深入研究。

参考文献(References)

常金梅,何衍彪,赵燕龙,柳凤,詹儒林,2010. 绿僵菌致病力的制约因素研究. 安徽农业科学,38(6):2815—2816.

丁福章,张泽华,张礼生,丁伟,2006. 绿僵菌对椰心叶甲的控制作用研究. 西南大学学报(自然科学版),28(3):454—456.

顾勇,张舒,2007. 绿僵菌对菜青虫的毒力及其引起的虫体组织病变. 湖北农业科学,46(3):399—400.

Hou YM, Weng ZQ, 2010. Temperature-dependent development and life table parameters of *Octodonta nipae* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environ. Entomol.*,39(5):1676—1684.

梁琼超,黄法余,赖天忠,徐北大,李志伟,陈升毅,2005. 从入境泰国种苗截获的危险性害虫水椰八角铁甲. 植物检疫,19(3):160—161.

Smith SE, Read DJ,1997. Mycorrhizal Symbiosis,2nd edition. Cambridge: Academic Press. 126—289.

宋漳,冯丽贞,景云,2002. 马尾松毛虫感染绿僵菌后某些生化指标的变化. 昆虫知识,39(4):297—300.

孙江华,虞佩玉,张彦周,王小君,2003. 海南省新发现的林业外来入侵害虫—水椰八角铁甲. 昆虫知识,40(3):286—287.

王海川,尤民生,1999. 绿僵菌对昆虫的入侵机理. 微生物学报,26(1):71—73.

White TJ, Bruns T, Lee S, 1990. Analysis of Phytogenetic Relationships by Amplification and Direct Sequencing of Ribosomal RNA Genes. A Guide to Methods and Applications. New York Academic. 315—322.

吴大军,杜奕华,陈秀绢,袁浩,李时斌,2007. 水椰八角铁甲的检验检疫及传人顺德的风险. 植物检疫,21(1):25—26.

Yang YH, Cai SX, Zheng YM, Lu XM, Xu XY, Han YM,2009. *Metarhizium taii* var. *chongqingensis* sp. nov., Anamorph of *Cordyceps chongqingensis* sp. nov. Isolated from a low altitude area in Chongqing, China. *Curr. Microbiol.*, 58: 635—641.

杨红,李颖,关国华,李秀玉,2002. 尖孢镰刀菌异核体及不同核型分离子 rDNA ITS 区序列分析. 农业生物技术学报,10(4):381—384.

张泽华,高松,张刚应,王扬,杨宝东,张卓然,郑双悦,王梦龙,2000. 应用绿僵菌油剂防治内蒙草原蝗虫的效果. 中国生物防治,16(2):49—52.

周权,黄勃,李世贵,王滨,胡丰林,彭凡,李增智,2005. 绿僵菌 ACCC30104 菌株的分子鉴定. 安徽农业大学学报,32(1):5—7.