几种虫生真菌菌株的培养性状及其对褐飞虱的毒力*

张松影** 林华峰*** 李茂业 金 立
(安徽农业大学植物保护学院 合肥 230036)

摘 要 从褐飞虱 *Nilaparvata lugens*(Stål)罹病虫体上新分离出的一种黄绿绿僵菌菌株 *Metarhizium flavoviride*(Mf82),与实验室保存的黄绿绿僵菌、金龟子绿僵菌和白僵菌3种菌种5个菌株作为对比,研究了在SDAY和PDA培养基上的培养性状,并测定了它们对褐飞虱成虫的毒力。结果表明:在SDAY培养基上,6个菌株菌落特征差异明显,Mf82菌株菌落直径增长量最大,产孢量最高,分别为2.59 mm,17.34 × 10^7 孢子/ cm^2,与其它菌株相比差异显著。Mf82菌株在SDAY培养基上生长优于PDA,Mf82菌株对褐飞虱成虫具有很强的毒力,以1.0 × 10^8 孢子/mL的孢子液接种到褐飞虱成虫体表上,累积校正死亡率达83.8%,LT_{50}为4.47 d,致死率明显高于其他真菌。Mf82菌株在褐飞虱的生物防治中很有应用前景。

关键词 黄绿绿僵菌,培养性状,褐飞虱,毒力

Culturing characteristics of entomogenous fungi strains and their virulence to *Nilaparvata lugens*(Stål)

ZHANG Song-Ying** LIN Hua-Feng*** LI Mao-Ye JIN Li
(School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract Six strains of entomogenous fungi; a new strain, *Metarhizium flavoviride* Mf82, isolated from *Nilaparvata lugens* (Stål) and two strains of *Beauveria bassiana* and three of *Metarhizium*, were cultured on SDAY and PDA and their virulence to adults of *N. lugens* compared. There were obvious differences in the growth of the six strains on SDAY; Mf82 grew faster and produced more spores than the other strains with a colony diameter growth rate of 2.59 mm per day and sporulation of 17.34 × 10^7 conidia/cm^2. SDAY was therefore a more suitable medium for Mf82 than PDA. Mf82 clearly controlled *N. lugens* adults; the LT_{50} value was 4.47 d and adjusted accumulative mortality was 83.8% at a concentration of 1.0 × 10^8 conidia/ml. Mf82 is therefore a promising biological pesticide for the control of *N. lugens*.

Key words *Metarhizium flavoviride*, cultural characteristics, *Nilaparvata lugens*, virulence

褐飞虱 *Nilaparvata lugens*(Stål)(BPH)是我国及亚洲东南部水稻主要害虫,不仅能直接刺吸为害水稻,而且还是多种植物病害的传毒媒介,如草状矮缩病(grassy stunt),齿叶矮缩病(ragged stunt)和萎蔫矮缩病(witted stunt),对水稻质量以及产量的影响极大。目前,国内外防治稻飞虱主要依靠化学农药、抗性品种选育和基因工程等,但是由于化学农药和转基因食品的安全问题,现在生物防治越来越受到重视(姜辉等,2005;陈峰等;2009)。昆虫病原真菌有容易生产、较强的专化性、可在自然界中再次侵染和对环境无污染的特点,已经被开发为微生物农药用于防治蚜虫(Vandenberg *et al.*,2001;Hatting *et al.*,2004)、粉虱(Malsam *et al.*,2002)、叶蝉(Feng *et al.*,2004;Pu *et al.*,2005)、螨类(Shi and Feng,2006)等多种农业害虫。昆虫病原真菌中,绿僵菌已被应用于蝗虫的防治(邱式邦,1994;Kooyman and Abdalla,1998),国内外已有学者通过培养真菌菌株的培养性状和生物测定方法筛选对褐飞虱具毒力的绿僵菌菌株,但没有一个菌株累计死亡率超过70%(Moor

* 资助项目:公益性行业(农业)科研专项(200803003)。
** E-mail: zhangsongying 1014@163.com
*** 通讯作者,E-mail: hf.lin@163.com
收稿日期:2011-08-09,接受日期:2011-08-25

et al.,1997; Jin *et al.*,2008; Roberts and Leger, 2004)。寻找高毒力致病真菌,是对其成功应用的关键。

本文利用从安徽滁州水稻田罹病褐飞虱成虫虫体上分离鉴定的一株黄绿绿僵菌新菌株,比较其与本室保存黄绿绿僵菌菌株 *Metarhizium flavoviride*、金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 和球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 菌株在不同培养基上培养性状及对褐飞虱的毒力,以期为进一步开发利用该菌开展生物防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌种与培养基

供试菌种及来源见表 1。采用萨氏葡萄糖酵母浸膏培养基(SDAY)、马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)。

1.2 供试昆虫

供试褐飞虱由 2009 年从安徽省霍邱县植保站提供虫种,并在安徽农业大学植保学院智能人工气候培养室内繁殖 10 代以上,可提供不同虫龄褐飞虱。

1.3 菌落培养特征

在 SDAY 和 PDA 培养基上分别用菌液点植培养法接种,蘸取供试真菌的分生孢子点植在培养平板表面,共 3 点,呈正三角形排列,每点呈一个圆形接种面,每菌株接 4 皿。接菌后分别置于(25 ± 1)℃、RH > 85 % 和 L∶D = 12∶12 光照培养箱培养。每 2 d 观测 1 次,记录菌落形态、颜色、质地及分生孢子粉色泽。从第 3 天开始,每 2 d 测量 1 次菌落纵横 2 个方向的直径,取其平均值,计算菌落每日直径增长量,15 d 后用直径为 6 mm 的打孔器分别从不同方向在菌落中心到边缘的中点取菌块 3 个,放入 5 mL 0.05 % Tween-80 无菌水中,在涡旋混合器上振荡 30 min,用血球计数板测定孢子含量,折合成每平方厘米菌落含孢子量。

1.4 Mf82 菌株与其他真菌菌株对褐飞虱成虫的毒力比较

将 6 个菌株分别接种于 SDAY 培养基平板上,在(25 ± 1) ℃条件下培养 10 d,待真菌充分产孢后,将各个菌株的分生孢子粉刮到分别盛有 5 mL 0.05 % Tween - 80 湿润剂的三角瓶中,在涡旋混合器上充分振荡 30 min,然后按比例稀释,血球计数板计数,配制成 1.0×10^8 个孢子/mL 浓度的悬浮液。试验以褐飞虱成虫为处理对象,共 6 个处理,每个处理 3 次重复,另设 3 个空白对照,只用 0.05% 吐温 - 80 的水溶液处理。共 21 个笼箱,每个笼箱接虫 30 头,用手握式喷雾器对褐飞虱成虫均匀喷施 1×10^8 孢子/mL 的孢子液 10 mL。喷施时在其中放置 3 块盖玻片(15 mm × 15 mm)收集孢子,镜检 5 个视野(0.785 mm^2/视野,5 点取样)并计数孢子数,以确定褐飞虱实际接收的剂量(孢子/mm^2)。将处理的褐飞虱置于 25℃、RH 85% 和光照 L∶D = 14∶10 的恒温培养箱中饲养。然后逐日统计褐飞虱存活虫数、死虫数和僵虫数。每隔 3 d 更换一次稻苗。

褐飞虱感染真菌的检测:分别收集实验过程中各处理组喷施过菌液的染病和死亡的褐飞虱,在实验室中保湿培养,分别从其体表和血腔进行真菌分离,并进行真菌学鉴别。

1.5 数据处理与分析

用各处理每天观察的平均活虫与死虫数计算各处理的死亡率,并以 Abbott 公式计算校正死亡率。

$$\text{校正死亡率}(\%) = \left[\frac{\text{处理组死亡率} - \text{对照组死亡率}}{1 - \text{对照组死亡率}}\right] \times 100$$

。回归方程、相关系数、致死中时(LT_{50})等处理间各统计量通过方差分析和 LSD 法检验进行比较,并用 DPS 软件完成。

2 结果与分析

2.1 不同培养基上菌落的形态特征

在 SDAY 培养基上培养的 6 个供试菌株,外观形态差异较大,大致可分为 3 种类型:菌落疏松型、菌落紧密型和菌落粉状。菌丝生长快、菌落呈粉状的菌株产孢早且孢子层厚;菌丝生长缓慢、菌落呈疏松型的菌株产孢少,其他菌株在生长速度与产孢方面介于两者之间。Mf82 菌株在 SDAY 和 PDA 2 种培养基上菌落形态差异明显,前者成粉状后者为疏松型,且前者比后者基质颜色深。在 25℃下培养 14 d 后,6 菌株的菌落特征见表 1(以 SDAY 平板上的培养特征为代表)。

表 1　6 株供试菌株的来源和菌落形态特征

Table 1　Origin and shape of colony of the six tested strains

菌株 Strains	寄主 Hosts	原始采集地 Original localities	菌落色泽 Color of colony	菌落形态 Shape of colony	基质色泽 Color of basifixed colony	孢子粉色泽 Color of spore power
Metarhizium flavoviride 82	褐飞虱 *Nilaparvata lugens*	安徽 滁州	黄绿色	薄粉状	淡黄色	黄绿色
M. flavoviride 96	白背飞虱 *Sogatella furcifera*	安徽 霍邱	黄绿色	绒毛状	桔黄色	黄褐色
*Metarhizium anisopliae*22	褐飞虱 *Nilaparvata lugens*	安徽 宣城	淡绿色	绒毛状	浅褐色	淡黄绿色
M. anisoplia 95	象蜡蝉 *Oliarus dimidiatus*	天津	绿色	薄粉状	黄褐色	黄褐色
Beauveria bassiana 53	蛴螬 *Holotrichia diomphalia*	安徽 舒城	白色	棉絮状	淡黄色	粉白色
B. bassiana 68	角蝉 *Leptocentrus taurus*	安徽 青阳	黄白色	薄粉状	黄褐色	乳白色

2.2　不同培养基对菌落生长速度及产孢量的影响

菌株营养生长快慢是反映菌株优良性状指标之一,试验对 6 个菌株进行了营养生长的比较测定,得菌落直径日增长量、产孢量值和开始产孢时间(表 2)。黄绿绿僵菌菌株 Mf82 和 Mf96 在 SDAY 培养基上生长较好而在 PDA 培养基上表现菌落直径增长缓慢,开始产孢时间短,产孢量小,说明 SDAY 培养基适合 Mf82 菌株生长与繁殖,而 PDA 培养基不适合其生长与繁殖。在 SDAY 培养基上,Mf82 菌株比其他菌株生长快,产孢量大,表明新分离 Mf82 菌株培养性状优于实验室保存菌株。金龟子绿僵菌 Ma22 和 Ma95 2 菌株更适合在 PDA 培养基上生长,而球孢白僵菌 Bb53 和 Bb68 2 菌株在 SDAY 和 PDA 2 种培养基上均生长良好。

表 2　供试菌株在不同培养基上的培养性状

Table 2　Characters of the tested strains in different media

菌株 Strains	菌落直径日增长量(mm) Colony diameter increase		开始产孢所需时间(d) Time of producing spores		产孢量($\times 10^7$ 孢子/cm^2) Sporulation	
	SDAY	PDA	SDAY	PDA	SDAY	PDA
Mf82	2.59 ± 0.17a	1.67 ± 0.06d	4.75 ± 0.29d	4.00 ± 0.41c	17.34 ± 0.91a	6.96 ± 0.66a
Mf96	1.73 ± 0.04b	1.95 ± 0.02ab	5.75 ± 0.65c	4.87 ± 0.48bc	10.82 ± 0.80b	7.45 ± 0.62a
Ma22	1.27 ± 0.05c	2.03 ± 0.05a	6.38 ± 0.48c	5.50 ± 0.41b	0.86 ± 0.08d	4.86 ± 0.41b
Ma95	1.34 ± 0.24c	1.88 ± 0.04bc	6.25 ± 0.65c	5.38 ± 0.63b	0.75 ± 0.03de	3.10 ± 0.38c
Bb68	1.83 ± 0.07b	1.87 ± 0.11bc	8.00 ± 0.71b	7.25 ± 0.29a	0.35 ± 0.09e	0.26 ± 0.78e
Bb53	1.65 ± 0.08b	1.76 ± 0.05cd	9.00 ± 0.71a	7.00 ± 0.41a	1.82 ± 0.08c	1.73 ± 0.05d

注: 表中数据为 mean ± SE; 同列相同小写字母表示 0.05 水平上差异不显著,下同。

Date are mean ± SE, and followed by the same letters in the same column indicate no significantly different at 0.05 level according to LSD test. The same below.

2.3　不同菌株对褐飞虱成虫的毒力

从室内毒力测定结果分析可知,受试 6 个真菌菌株对稻飞虱成虫均有不同程度的致病性,且致死率差异明显(表 3)。黄绿绿僵菌 Mf82 和 Mf96 2 菌株以及金龟子绿僵菌 Ma22 菌株累计校正死亡率超过 50%,其中黄绿绿僵菌 Mf82 菌株校正累计死亡率最高,致死速度最快,累计校正死亡率达 83.8%,LT_{50}为 4.47 d,显著高于其他受测菌株。表明黄绿绿僵菌 Mf82 菌株对褐飞虱成虫有较高的毒力。罹病虫体僵硬,腹部节间、头部和腿足长出白色菌丝体。从僵虫率看,除白僵菌 Bb53 未出现僵虫外,其他各处理死亡褐飞虱成虫 24 h 后均出现僵虫,其中黄绿绿僵菌 Mf82 僵虫率最高,达 88.9%。各供试真菌菌株都能侵染致死褐飞虱成虫,并能通过僵虫散布孢子在害虫种群中再侵染。试验表明筛选的 Mf82 菌株对褐飞虱成虫有明显致病效果,而另外 5 个菌株毒力相对较低。

表 3 不同菌株对褐飞虱成虫的致病效果

Table 3 Pathogenic effect to the adults of BPH treated with the different tested strains

处理 Treatment	累积死亡率(%) Accumulative mortality rate	累积校正死亡率(%) Adjusted accumulative mortality rate	毒力回归方程 Regression equation	相关系数(r) Correlation coefficient	LT_{50} (d)	僵虫率(%) Rigid cadaver rate
Mf82	84.3 ± 0.76a	83.8 ± 0.79a	$Y = 2.5854 + 3.3197X$	0.9946	4.47	88.9 ± 0.8
Mf96	55.3 ± 1.04c	53.8 ± 1.08c	$Y = 2.1063 + 3.1531X$	0.9816	7.53	64.6 ± 5.7
Ma22	63.0 ± 0.50b	61.7 ± 0.52b	$Y = 2.2578 + 3.1024X$	0.9946	6.93	77.6 ± 4.4
Ma95	30.5 ± 1.32d	28.1 ± 1.36d	$Y = 1.2652 + 3.3160X$	0.9823	21.4	23.8 ± 9.5
Bb68	31.3 ± 2.75d	28.9 ± 2.84d	$Y = 2.6173 + 1.7699X$	0.9842	22.1	17.7 ± 3.9
Bb53	11.5 ± 1.50e	8.5 ± 1.55e	$Y = 1.7699 + 2.3194X$	0.8333	32.7	—
CK	3.3 ± 0.00f	—	—	—	—	—

3 小结与讨论

相关研究表明,真菌菌株的培养性状与菌株的毒力有关(唐晓庆等,1996; Moor *et al.*,1997)。Wang 等(2005)研究表明菌株菌落形态与毒力具有相关性。蔡国贵(2003)认为产孢量大的菌株对刚竹毒蛾 *Pantana phyllostachysae* 具有更强的毒力。本实验中的 Mf82 菌株菌落呈粉状质地,菌丝生长与产孢量均明显优于室内保存的其它 5 个菌株,其毒力也较强,说明具有一定的相关性。Mf82 菌株在不同培养基上生长情况差异明显,在 SDAY 上生长良好,在 PDA 上不能正常生长。这说明培养基中 N 素含量对黄绿绿僵菌生长有直接影响。

筛选优良昆虫病原真菌菌株防治农林害虫一般通过生物测定完成,死亡率、僵虫率和 LT_{50} 等指标均可反映出菌株的毒力强弱,死亡率和感染率越大,LT_{50} 越小,致病力越强(刘玉军等,2008; 赵文琴等,2005; 蔡守平等,2008; 徐艳聆等,2010)。本研究通过从褐飞虱罹病虫体上新分离出的一株黄绿绿僵菌 Mf82 菌株,与实验室保存的其他不同种类真菌菌株对褐飞虱成虫进行了毒力比较,结果表明,来源于褐飞虱的 Mf82 和 Ma22 2 个菌株对褐飞虱成虫表现出较高的毒力,因为虫生真菌对寄主具有专化性。Jackson 等(1985)认为虫生真菌对原始寄主的毒力略高于其他寄主,而本试验中 Mf82 和 Ma22 2 个菌株的原寄主正是我们的防治目标害虫,对原寄主种类的害虫进行生物防治容易取得成功。各菌株比较起来,Mf82 菌株对褐飞虱的毒力最强,褐飞虱的致死率和僵虫率达 80% 以上,明显高于其他受测菌株,是一种很好的生防材料,在褐飞虱的生物防治中很有应用前景。

参考文献(References)

蔡国贵,2003. 刚竹毒蛾白僵菌优良菌株筛选及生产应用研究. 林业科学,39(2):102—108.

蔡守平,刘建波,何学友,李志真,吴柳清,2008. 金龟子绿僵菌,球孢白僵菌不同菌株对星天牛成虫的生物测定. 中国森林病虫,27(2):1—4.

陈峰,傅强,罗举,赖凤香,桂连友,2009. 苗期抗性不同的水稻品种成株期对褐飞虱的抗性. 中国水稻科学,23(2):201—206.

Feng MG, Pu XY, Ying SH, Wang YG, 2004. Field trials of an oil-based emulsifiable formulation of *Beauveria bassiana* conidia and low application rates of imidacloprid for control of falseeye leafhopper *Empoasca vitis in southern* China. *Crop Protection*, 23(6):489—496.

Hatting JL, Wraight SP, Miller RM, 2004. Efficacy of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) for control of Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) on resistant wheat under field conditions. *Biocontrol Science and Technology*, 14(5):459—473.

姜辉,林荣华,刘亮,瞿唯钢,陶传江,2005. 稻飞虱的危害及再猖獗机制. 昆虫知识,42(6):612—615.

Jakson CD, Heale JB, Hall RA, 1985. Taits associated with virulence to the aphid *Macrosiphoniella sanborni* in eighteen isolates of *Verticillium lecanii*. *Ann. Appl. Biol.*, 106(1):39—48.

Jin SF, Feng MG, Chen JQ, 2008. Selection of global *Metarhizium* isolates for the control of the rice pest *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *Pest Management Science*, 64(10):1008—1014.

Kooyman C, Abdalla OM, 1998. Application of *Metarhizium flavoviride* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) spores against the tree locust, *Anacridium melanorhodon* (Orthoptera: Acrididae), in Sudan. *Biocontrol Science and Technology*,

8(2):215—219.

刘玉军，张龙娃，何亚琼，王滨，丁德贵，2008. 栎旋木柄天牛高毒力球孢白僵菌菌株的筛选. 昆虫学报，51(2):142—149.

Malsam O，Kilian M，Oerke EC，Dehne HW，2002. Oils for increased efficacy of *Metarhizium anisopliae* to control whitefiies. *Biocontrol Science Technology*，12:337—348.

Moor D，Langewald J，Obognon F，1997. Effects of rehydration on the conidial viability of *Metarhizium flavoviride* mycopesticide formulations. *Biocontrol Science Technology*，7(1):87—94.

Pu XY，Feng MG，Shi CH，2005. Impact of three application methods on the field efficacy of a *Beauveria bassiana*-based mycoinsecticide against the false-eye leafhopper，*Empoasca vitis* (Homoptera: Cicadellidae) in tea canopy. *Crop Protection*，24(2):167—175.

邱式邦，1994. 1993 年非洲利用绿僵菌油剂防治蝗虫和蚌蠕的试验结果. 生物防治通报，10(4):186.

Roberts DW，Leger RJ，2004. *Metarhizium* spp.，cosmopolitaninsect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Advances in Applied Microbiology*，54:1—70.

Shi WB，Feng MG，2006. Field efficacy of application of *Beauveria bassiana* formulation and low rate pyridaben for sustainable control of citrus red mite *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae) in orchards. *Biolocogical Control*，39(2):210—217.

唐晓庆，樊美珍，李增智，1996. 球孢白僵菌继代培养中菌落局变现象及环境影响因素的研究. 真菌学报，15(3):188—196.

Vandenberg JD，Sandvol LE，Jaronski ST，Jackson MA，Souza EJ，Halbert SE，2001. Efficacy of fungi for control of Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) in irrigated wheat. *Southwestern Entomologist*，26(1):73—85.

Wang CS，Tariq MB，Raymond JSL，2005. Colony sectorization of *Metarhizium anisopliae* is a sign of ageing. *Microbiology*，151(10):3223—3236.

徐艳聆，吕文彦，杜开书，王 蕊，张萌萌，2010. 亚洲玉米螟优良球孢白僵菌菌株的筛选. 中国农学通报，26(21):278—281.

赵文琴，樊美珍，蔡守平，赵学球，2005. 不同绿僵菌、白僵菌菌株对铜绿丽金龟幼虫的毒力生物测定. 生物学杂志，22(5):43—45.