

感染椰心叶甲绿僵菌菌株的筛选

吴青^{1,2}, 曾玲¹, 徐大高¹, 陆永跃¹

(¹华南农业大学昆虫生态研究室, 广东广州 510642; ²深圳出入境检验检疫局, 广东深圳 518045)

摘要: 从田间感病的椰心叶甲虫尸上分离所得病原菌, 经逐步筛选获得最优的绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* BMa-9 菌株。其菌落生长率为 6.14 mm/d, 平均产分生孢子量 $3.91 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$, 孢子萌发率 87.32%。1 × 10⁶ mL⁻¹ 孢子悬浮液处理椰心叶甲时, 对 3 龄幼虫具很强感染力, 第 3 d 平均感染率 61%, 第 8 d 平均死亡率 97%。

关键词: 椰心叶甲; 绿僵菌; 筛选; 侵染力

中图分类号: S482 文献标识码: A 文章编号: 1001-411X(2006)02-0032-03

Screening of *Metarhizium anisopliae* Strains for Controlling *Brontispa longissima*

WU Qing^{1,2}, ZENG Ling¹, XU Da-gao¹, LU Yong-yue¹

(¹ Lab of Insect Ecology, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China ;

² Shenzhen Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518045, China)

Abstract: The pathogenies were isolated from the natural population of *Brontispa longissima* (Gestro), and the strains of *Metarhizium anisopliae* were screened. The BMa-9 was the most effective strain. The growth rate of BMa-9 was 6.14 mm/d. The production of spore was $3.91 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$, and the germination capacity of spore was 87.32%. The result showed that the strain had the high infectivity to the third instar larvae of *B. longissima*. The infection rate was 61% after 3 d and the mortality was 97% after 8 d under the dosage of $1.0 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$.

Key words: *Brontispa longissima* (Gestro); *Metarhizium anisopliae*; screening; infectivity

椰心叶甲 *Brontispa longissima* (Gestro) 属鞘翅目 Coleoptera, 叶甲总科 Chrysomeloidea, 铁甲科 Hispididae, 潜甲亚科 Anisoderiane, 平胸族 Cryptonychini, 是棕榈科植物的一种毁灭性害虫, 广泛分布于马来西亚、印度尼西亚、太平洋的多个群岛、澳大利亚以及中国的台湾和香港等国家和地区。近年来, 椰心叶甲随着棕榈类植物从国外大量的引种而入侵。染虫的棕榈植物心叶枯死, 树势十分衰弱濒临死亡, 对棕榈的经济产业及生态安全屏障构成严重威胁^[1-3]。绿僵菌是一种重要的昆虫病原真菌, 其寄主范围较广, 达 8 目 42 科 204 种, 对甲虫类侵染寄生尤为常见^[4]。国内外曾成功利用绿僵菌防治椰心叶甲^[5-7]。本试验通过稀释平板法和单孢分离技术直接从感病的椰心叶甲成虫、幼虫中分离昆虫病原真菌, 并根据 Tulloch^[8]

和 Hoog^[9] 的分类系统进行鉴定, 然后筛选出产孢量高、孢子萌发率高和致病力强的优良菌株, 为持续控制椰心叶甲提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源: 于深圳棕榈科寄主植物上采集长有白色菌丝或已覆盖绿色孢子的椰心叶甲虫尸供分离病原真菌。用于回接的虫源在深圳椰心叶甲发生区采集, 在实验室内挑选健康个体分虫态、虫龄饲养备用。

寄主植物: 室内饲养用寄主植物为椰子 *Cocos nucifera* 新鲜心叶。

供试培养基: 萨氏培养基 (SDAY): 0.1% (w) 酵母膏 10 g + 琼脂 15 g + 葡萄糖 50 g + 水 1 000 mL。

收稿日期: 2005-09-01

作者简介: 吴青 (1972-), 女, 博士研究生; 通讯作者: 曾玲 (1949-), 女, 教授; E-mail: zengling@scau.edu.cn

基金项目: 国家“973”计划项目 (2002CB111400); 广东省植物检疫项目 (粤农函 2004[50] 号); 深圳市农业局科技项目“椰心叶甲防治技术研究”

供试菌株:从田间感病椰心叶甲虫尸上分离所得绿僵菌,经单孢子分离培养所得的绿僵菌各菌株。

1.2 方法

1.2.1 椰心叶甲病原真菌的分离与鉴定 用质量分数为5%的次氯酸钠溶液对感病的椰心叶甲虫尸样品进行表面消毒后接入加500 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的SDAY平板中,倒置于28℃的培养箱中培养,待菌落形成后,转入SDAY斜面培养基,生长7d后,置4℃冰箱中保存备用。将分离所得的菌株在SDAY平板培养基上培养8d形成菌落并长出大量孢子后,加入含体积分数为0.02%的吐温-80无菌水收集孢子,后移入烧杯中,磁力加热搅拌器搅拌15 min,得到适当浓度的孢子悬浮液($1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$),均匀喷于海南椰子心叶叶片和椰心叶甲体表,在加盖尼龙网的塑料盒中饲养,保持相对湿度90%以上。5d后挑取感染死亡的椰心叶甲分离获得菌株。利用40×10倍的自带光源立体显微镜进行镜检。根据病原菌的培养性状、菌丝和分生孢子的形态进行鉴定。

1.2.2 绿僵菌分离株的获得 采用稀释平板法和单孢分离技术对BMa菌株进行分离培养,获得12个单孢菌株,并编号为BMa-1、BMa-2、BMa-3、BMa-4、BMa-5、BMa-6、BMa-7、BMa-8、BMa-9、BMa-10、BMa-11、BMa-12,将获得的分离株接入SDAY平板,于28℃的生化培养箱中培养,供筛选用。

1.2.3 绿僵菌分离株的逐步筛选 (1)菌落生长速率和产孢量的测定:用无菌水配制12个菌株的分生孢子悬浮液,各取1 mL滴入SDAY平板,用三角玻棒涂匀,28℃培养4d,用直径为13 mm的灭菌打孔器钻取新鲜菌落接种于SDAY平板培养。每2d观测菌落生长情况,将第8d测量的菌落直径除以培养天数,即为菌落生长率。用直径为5 mm的灭菌打孔器在培养皿中心钻取新鲜菌块,加体积分数为0.02%的吐温-80和20 mL无菌水,将所配悬浮液用磁力加热搅拌器搅拌15 min,使孢子充分分散,用血球计数板测定产孢量。每菌株设5次重复。(2)孢子萌发率的测定:将上步筛选出的6个菌株培养10d,收集分生孢子进行萌发试验,在28℃、相对湿度100%,培养24h后镜检,萌发的孢子数除以孢子总数即为萌发率。每菌株设5次重复。(3)菌株对椰心叶甲3龄幼虫致病力的测定:将6个菌株培养18d,配制成孢子含量为 $1.0 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 的悬浮液。取同样大小的新鲜未受农药污染的海南椰子心叶叶片,每片叶挑入4头3龄椰心叶甲幼虫,将各菌株的孢子悬浮液均匀喷洒在叶片与椰心叶甲的体表,稍晾干后放在灭菌培养皿里,24~28℃下保温(相对湿度90%以上)饲养,每

皿放同处理的叶片5片,即每皿20头幼虫,用尼龙网将培养皿口封好。每日观察幼虫的感染和死亡情况,第3d统计绿僵菌对椰心叶甲幼虫的感染率(感染率为感病虫头数与处理数的比值),然后将虫尸放在潮湿的培养皿内观察病原孢子形成,从而来确定椰心叶甲死亡是否由感染病原导致的。连续观察8d,适时换叶。死亡率为死亡虫数与处理虫数的比值。每个处理设5个重复,设置加吐温-80的无菌水为对照。

2 结果与分析

2.1 病原菌的分离与鉴定

从被虫生真菌自然感染的椰心叶甲虫体上分离获得的野生菌株,经鉴定为3种,分别是金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae*、球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 和卵孢白僵菌 *Beauveria brongniatii*。

据田间采集的椰心叶甲虫尸观察,体表多布满暗绿色的孢子。在用以分离的每个平板上都培养出绿僵菌。分离到的野生菌株中以绿僵菌的菌株为主,占菌落数量的75%以上。其分生孢子大小平均为 $6.3 \mu\text{m} \times 2.5 \mu\text{m}$,根据Tulloch分类系统鉴定是分生孢子小型的 *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*。本试验只将野生的绿僵菌菌株回接于椰心叶甲复壮,获得绿僵菌株(以下简称BMa菌株)。它们在SDAY培养基上形成暗绿色的分生孢子,且分生孢子很浓密。

2.2 绿僵菌分离株的筛选

2.2.1 菌落生长速率和产孢量 由表1可见,虽然12个菌株生长率差异显著,但其菌落直径平均每天

表1 绿僵菌12个菌株8d后的菌落生长率和孢子产量¹⁾

Tab.1 The growth rate and production of spore of different *Metarhizium anisopliae* strains after eight days

菌株 strain	生长率 growth rate/(mm · d ⁻¹)	分生孢子产量 production of spore/mL ⁻¹
BMa-1	5.31 ± 0.07de	2.92 × 10 ⁹ ± 0.03 × 10 ⁹ h
BMa-2	5.33 ± 0.09de	3.07 × 10 ⁹ ± 0.05 × 10 ⁹ g
BMa-3	5.16 ± 0.01g	2.77 × 10 ⁹ ± 0.02 × 10 ⁹ j
BMa-4	5.26 ± 0.05ef	2.88 × 10 ⁹ ± 0.02 × 10 ⁹ h
BMa-5	5.20 ± 0.03fg	2.83 × 10 ⁹ ± 0.02 × 10 ⁹ ij
BMa-6	5.72 ± 0.06c	3.17 × 10 ⁹ ± 0.04 × 10 ⁹ f
BMa-7	6.07 ± 0.04a	3.72 × 10 ⁹ ± 0.05 × 10 ⁹ c
BMa-8	5.98 ± 0.04b	4.01 × 10 ⁹ ± 0.05 × 10 ⁹ a
BMa-9	6.14 ± 0.03a	3.91 × 10 ⁹ ± 0.03 × 10 ⁹ b
BMa-10	5.70 ± 0.04c	3.26 × 10 ⁹ ± 0.04 × 10 ⁹ e
BMa-11	5.68 ± 0.04c	3.42 × 10 ⁹ ± 0.06 × 10 ⁹ d
BMa-12	5.38 ± 0.04d	2.96 × 10 ⁹ ± 0.02 × 10 ⁹ h

1) 同列数据后不同字母表示在0.05水平上差异显著(Duncan's法)

都增长 5 mm 以上,属于生长迅速的类型.其中 BMa-9 分离株生长最快,其菌落直径的平均生长率为 6.14 mm/d,其次 BMa-7 为 6.07 mm/d.不同菌株间产孢量有显著差异,BMa-8 菌株产孢量最大为 $4.01 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$,其次 BMa-9 为 $3.91 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$.综合菌落平均生长率与平均产孢量的实验结果,选出 BMa-9、BMa-7、BMa-11、BMa-10、BMa-6、BMa-8 菌株进入孢子萌发率试验.

2.2.2 分生孢子萌发率 将绿僵菌 6 个菌株培养 10 d 后的分生孢子进行萌发试验,24 h 后的萌发率见表 2.由表 2 可见,培养 10 d 后绿僵菌 6 个菌株分生孢子的萌发率存在差异.分生孢子的萌发率最高的是 BMa-7 和 BMa-8,分别为 91.25% 和 90.70%.其次是 BMa-9 和 BMa-10,分别为 87.32% 和 86.41%.

表 2 绿僵菌 6 个菌株 10 d 后分生孢子的萌发率¹⁾

Tab.2 Germination capacity of different *Metarhizium anisopliae* strains after culturing for ten days

菌株	观察孢子个数	孢子萌发率
strain	number of spore	germination capacity of spore/%
BMa-6	513	83.83 ± 0.12 c
BMa-7	547	91.25 ± 0.07 a
BMa-8	539	90.70 ± 0.11 a
BMa-9	570	87.32 ± 0.09 b
BMa-10	521	86.41 ± 0.07 b
BMa-11	525	84.37 ± 0.10 c

1) 同列数据后不同字母表示在 0.05 水平上差异显著 (Duncan's 法)

2.2.3 绿僵菌 6 个菌株对椰心叶甲 3 龄幼虫的致病力 在喷施孢子悬浮液 36 h 后,被处理的幼虫开始出现感染症状.幼虫活动滞缓、取食量明显减少,2 d 后虫体体色由原来半透明的淡黄色变为不透明的乳白色,3 d 后虫体开始僵直,可在头部与腹部末端观察到白色菌丝,幼虫开始死亡.由表 3 可见,处理 3 d

表 3 绿僵菌 6 个菌株对椰心叶甲 3 龄幼虫的致病力¹⁾

Tab.3 Determination of the pathogenicity of six *Metarhizium anisopliae* strains against third instar larva of *Brontispa longissima*

菌株	感染率	死亡率
strain	infection percentage/%	mortality rate/%
BMa-6	34 ± 1.87 d	73 ± 2.00 d
BMa-7	55 ± 1.58 bc	87 ± 2.74 bc
BMa-8	57 ± 1.23 ab	89 ± 1.87 b
BMa-9	61 ± 1.87 a	97 ± 1.23 a
BMa-10	57 ± 2.55 ab	94 ± 1.00 a
BMa-11	51 ± 1.87 c	84 ± 1.87 c

1) 同列数据后不同字母表示在 0.05 水平上差异显著 (Duncan's 法)

后 BMa-9 菌株最高感染率为 61%;其次是 Ma-10、BMa-8、BMa-7、BMa-11、BMa-6,感染率分别为 57%、57%、55%、51%、34%.经 BMa-9 菌株处理的椰心叶甲第 8 d 平均死亡率最高,为 97%.

3 结论

筛选优良菌株时,致病性和产孢量是重要的参考指标,其次比较的是孢子萌发率和菌落平均生长速率^[4].6 个菌株对椰心叶甲 3 龄幼虫的致病力测定的结果是 BMa-9 菌株的效果最好,第 3 d 平均感染率为 61%,第 8 d 平均死亡率为 97%.培养 8 d 后绿僵菌 12 个菌株的菌落生长率是 BMa-9 分离株生长最快,8 d 内其菌落直径的平均生长率为 6.14 mm/d.培养 10 d 的绿僵菌 6 个菌株分生孢子的萌发率测定中,BMa-9 分离株在 6 个菌株中萌发率为 87.32 排第 3 位.可见,BMa-9 菌株具有生长迅速、产孢量大、孢子萌发率高及对椰心叶甲 3 龄幼虫的高致病力的优良性状,它将是防治椰心叶甲的优良的绿僵菌菌株.但在进行田间防治时要达到理想效果,必须对绿僵菌的剂型、施用剂量、方法、适宜防治时间以及影响因子等开展进一步研究.

参考文献:

- [1] 陈世骧. 中国动物志:鞘翅目、铁甲科[M]. 北京:科学出版社,1986:3-14.
- [2] 陈小帆,武目涛. 广东口岸进境植物检疫截获疫情工作[J]. 植物检疫,2004,18(3):187-188.
- [3] 陈义群,黄宏辉,林明光,等. 椰心叶甲在国外的发生及防治[J]. 植物检疫,2004,18(4):250-253.
- [4] 蒲哲龙,李增智. 昆虫真菌学[M]. 合肥:安徽科学技术出版社,1996:1-11.
- [5] VOEGELE J M. Biological control of *Brontispa longissima* in Western Samoa: An ecological and economic evaluation [J]. Agriculture, Ecosystems and Environment, 1989, 27: 315-329.
- [6] HSIEH C Y, HUAN W K, KAO S S, et al. Production of destruxins from a local entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, by solid-state and submerged fermentation [J]. Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society, 1998, 36(4): 371-379.
- [7] LIU S D, LIN S C, SHIAU J F. Microbial control of coconut leaf beetle (*Brontispa longissima*) with green muscardine fungus, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1989, 53(3): 307-314.
- [8] TULLOCH M. The genus *Metarhizium* [J]. Trans Brit Mycol Soc, 1976, 66: 407-411.
- [9] de HOOG G S. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* [J]. Stud Mycol, 1972(1): 1-41.

【责任编辑 周志红】