



代晓彦,李翌茵,许炜明,等. 亚洲柑橘木虱 2 株高致病力病原真菌菌株的筛选[J]. 华南农业大学学报,2016,37(5):62-65.

亚洲柑橘木虱 2 株高致病力病原真菌菌株的筛选

代晓彦^{1,2}, 李翌茵¹, 许炜明¹, 沈祖乐¹, 黄 振¹, 吴建辉¹, 任顺祥¹, 邱宝利¹

(1 华南农业大学 农学院/广东省生物农药创制与应用重点实验室/广东省农业害虫生物防治工程技术研究中心, 广东 广州 510640; 2 山东省农业科学院 植物保护研究所, 山东 济南, 250100)

摘要:【目的】筛选对亚洲柑橘木虱 *Diaphorina citri* Kuwayama 具有高致病力的真菌菌株,为其微生物农药的研发奠定基础。【方法】测定 5 株球孢白僵菌 *Beauveria bassiana*(菌株 A~E)和 5 株玫烟色棒束孢菌 *Isaria fumosorosea* 菌株(菌株 A~E)的生长速率、产孢量以及对木虱若虫的侵染致死率等,并进行比较分析。【结果】5 株球孢白僵菌培养 10 d 后产孢量存在较大差异,A 菌株的产孢量最少($7.96 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$),E 菌株的产孢量最多($3.78 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$),两者差异显著;在喷施球孢白僵菌孢子 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 7 d 后,对柑橘木虱低龄若虫的致死率与对照差异不显著,以 A 菌株的致死率最高(78.0%),E 菌株次之(77.0%)。5 株玫烟色棒束孢菌株培养 10 d 后,B 菌株产孢量最多($6.04 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$),E 菌株的最少($6.28 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$),两者差异显著;在喷施玫烟色棒束孢孢子 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 7 d 后,除 D 菌株外,其他制剂对亚洲柑橘木虱低龄若虫的致死率均显著大于对照,B 菌株的致死率最高(81.0%)。【结论】综合考虑产孢量及致病力等指标,球孢白僵菌 E 菌株和玫烟色棒束孢 B 菌株是具有良好研发前景的柑橘木虱生物防治高致病力优良菌株。

关键词:柑橘木虱;球孢白僵菌;玫烟色棒束孢;致病力;生物防治

中图分类号:S433.3

文献标志码:A

文章编号:1001-411X(2016)05-0062-04

Screening two entomopathogenic fungal strains with high virulence against Asia citrus psyllid, *Diaphorina citri*

DAI Xiaoyan^{1,2}, LI Yihan¹, XU Weiming¹, SHEN Zule¹, HUANG Zhen¹,
WU Jianhui¹, REN Shunxiang¹, QIU Baoli¹

(1 College of Agriculture, South China Agricultural University/Key Laboratory of Bio-Pesticide Innovation and Application/Engineering Technology Research Center of Agricultural Pest Biocontrol of Guangdong Province, Guangzhou 510640, China;
2 Plant Protection Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Ji'nan 250100, China)

Abstract:【Objective】To screen entomopathogenic fungal strains with high virulence against Asia citrus psyllid (ACP), *Diaphorina citri* Kuwayama, and to provide a basis for development of microbial pesticide against ACP. 【Method】The growth and sporulation rates of five *Beauveria bassiana* strains numbered A to E and five *Isaria fumosorosea* strains numbered A to E, and the mortality rates of ACP after infected by these ten fungal strains were investigated. 【Result】The spores quantity of five *B. bassiana* strains were significantly different after cultured for 10 days, strain E had the largest spores quantity ($3.78 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$) and strain A had the least spores quantity ($7.96 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$). There was significant difference of spores quantity between strain E and strain A. There was no significant difference among the mortality

收稿日期:2016-01-14 优先出版时间:2016-07-05

优先出版网址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20160705.1159.014.html>

作者简介:代晓彦(1988—)女,硕士,E-mail:abeamsunshine@163.com;通信作者:邱宝利(1973—)男,教授,博士,
E-mail:baileyqiu@scau.edu.cn

基金项目:广东省科技计划项目(2015A020209140);广东省普通高校省级重大科研项目(2014-16);广州市产学研协同创新重大专项对外科技合作项目(201604030029);广州市科技计划项目(201509010023)

rates of 2-3 instar ACP nymphs seven days after the spray of $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ *B. bassiana* fungal spores, and the highest mortality rate (78.0%) was found in the strain A treatment, followed by the strain E treatment (77.0%). For five *I. fumosorosea* strains, the spores quantity after cultured for 10 days, strain B had the highest sporulation rate ($6.04 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$) and strain E had the least spores quantity ($6.28 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$). There was significant difference of spores quantity between strain B and strain E. The mortality rates of 2-3 instar ACP nymphs seven days after the spray of $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ *I. fumosorosea* fungal spores were higher than the control group except strain D. ACP infected by strain B had the highest mortality rate (81.0%). 【Conclusion】*B. bassiana* strain E and *I. fumosorosea* strain B are considered with high virulence against ACP and can be potentially used for biological control of ACP.

Key words: *Diaphorina citri*; *Beauveria bassiana*; *Isaria fumosorosea*; pathogenicity; biological control

亚洲柑橘木虱 *Diaphorina citri* Kuwayama 属于半翅目 Hemiptera 木虱科 Psyllidae, 主要危害柑橘 *Citrus reticulata*、橙 *Citrus sinensis*、柚 *Citrus maxima*、黄皮 *Clausena lansium*、柠檬 *Citrus limon*、九里香 *Murraya paniculata* 等芸香科植物的新芽嫩梢, 成虫和若虫在果树嫩叶、嫩芽和新梢上取食, 吸食嫩芽嫩梢汁液, 导致其萎缩, 新叶畸形易脱落, 严重影响植物的生长; 同时, 若虫的白色分泌物可以引发煤污病^[1-2]。然而, 与其直接取食为害相比, 柑橘木虱最大的危害是传播黄龙病 (Huanglongbing, HLB) 病菌^[3]。柑橘木虱已广泛分布在广东、福建、广西、江西、贵州等柑橘产区^[4], 随着气候变暖, 其分布范围有向北蔓延的趋势^[5-6]。目前, 柑橘木虱的防控主要以化学方法为主, 但长期大量地使用化学农药, 不仅造成害虫抗药性增强^[7-8]、生态环境污染等负面影响, 而且果实农药残留也会直接或间接地危害人体健康。研发高效的非化学防治技术是柑橘木虱综合治理的重要内容, 也是当前木虱防控研究的热点和难点。

病原真菌防治昆虫具有毒性低、不污染环境、在自然环境中可不断增殖、不易使害虫产生抗性等优点。本研究以广东省农业害虫生物防治工程技术研究中心继代保存的球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 和玫烟色棒束孢 *Isaria fumosorosea* 为研究对象, 筛选对柑橘木虱具有高致病力的菌株, 以期对柑橘木虱生防菌的开发应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

柑橘木虱采集于华南农业大学校园内九里香植株上, 种群饲养于生物防治教育部工程研究中心试验网室内, 寄主植物为九里香。

九里香种苗购置于广州市增城区苗圃基地, 钵栽 (1.5 L) 于生物防治教育部工程研究中心网室内, 定时浇水、施肥、剪枝, 保证九里香经常有嫩梢嫩芽

出现。

试验选用的球孢白僵菌和玫烟色棒束孢菌株为广东省生物防治教育部工程研究中心继代保存菌株, PDA 培养基 (马铃薯 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 葡萄糖 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、琼脂 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 培养, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存。

1.2 方法

1.2.1 球孢白僵菌和玫烟色棒束孢菌株的菌落生长速率和产孢量的测定 在 100 mL 去离子水中加入 $30 \mu\text{L}$ 的吐温 80, 配置成 0.03% (φ) 的吐温 80 无菌水, 用该无菌水洗脱试管斜面保存的球孢白僵菌 A~E 菌株和玫烟色棒束孢 A~E 菌株, 配制成 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 的分生孢子悬浮液, 取 1 mL 孢子悬浮液滴入直径为 9 cm 的 PDA 平板, 用三角玻璃棒涂匀, 每株菌株重复 5 个平板。在 $(26 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下培养 10 d, 每隔 2 d 测量并记录各个菌落的直径。10 d 后, 各个菌落经 0.03% (φ) 的吐温 80 无菌水洗脱, 过滤至无菌的三角瓶中, 用血球计数器测定每个菌株的产孢量。

1.2.2 球孢白僵菌和玫烟色棒束孢菌株对柑橘木虱低龄若虫的致病力的测定 将 5 株球孢白僵菌和玫烟色棒束孢菌株接种于 PDA 平板上培养 10 d 后, 用 0.03% (φ) 的吐温 80 无菌水收集分生孢子, 配制成 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 的孢子悬浮液, 剪取含有柑橘木虱低龄若虫的九里香嫩梢 (每个嫩梢上留有 20 头 2~3 龄若虫), 将嫩芽浸入悬浮液中, 20 s 后取出自然晾干, 对照浸入 0.03% (φ) 的吐温 80 无菌水中。将处理及对照组的九里香嫩梢放在铺有滤纸的培养皿内, 置于 $(26 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$, 湿度 $85\% \sim 90\%$, 光照周期 12 h 光: 12 h 暗的培养箱中培养, 7 d 后检查并记录各个处理中柑橘木虱若虫的感染死亡率。每个菌株设置 5 个重复。

1.3 数据处理

采用 SAS 8.01 处理数据, 用 Tukey 检验法比较各个病原菌株在菌株直径、产孢量及对柑橘木虱致病力的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 球孢白僵菌菌株的菌落生长速率和产孢量

试验结果(图1)表明,5株球孢白僵菌菌株的生长速率接近,相互之间差异不显著。在PDA培养基上培养10 d后,5个菌落直径为41.2~46.8 mm,其中,球孢白僵菌E菌株的直径最大,达到46.8 mm,生长速率最快。5株球孢白僵菌菌株的产孢量存在较大差异,其中,A菌株的产孢量最少,约为 $7.96 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$,E菌株的产孢量最大,达到 $3.78 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ (表1)。

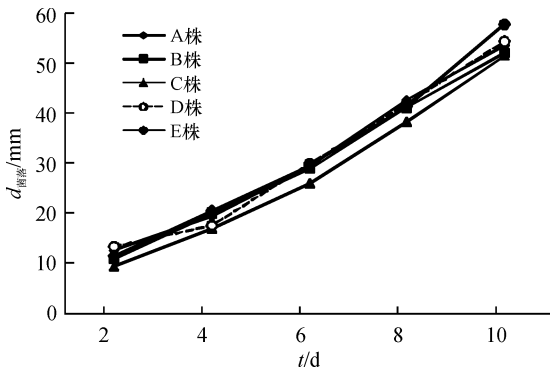


图1 球孢白僵菌的菌落生长速率

Fig. 1 The growth rates of different *Beauveria bassiana* colonies

表1 球孢白僵菌菌株的生长10 d的菌落直径和产孢量¹⁾

Tab. 1 The colony diameters and sporulation of *Beauveria bassiana* after 10 days growth

菌株	$d_{\text{菌落}}/\text{mm}$	产孢量/ $\times 10^7 \text{ mL}^{-1}$
A	$41.2 \pm 2.18\text{a}$	7.96c
B	$41.6 \pm 2.54\text{a}$	10.70bc
C	$42.6 \pm 1.29\text{a}$	26.40ab
D	$41.4 \pm 3.19\text{a}$	10.20bc
E	$46.8 \pm 1.94\text{a}$	37.80a

1) 同列数据后凡具有一个相同字母者,表示差异不显著($P > 0.05$, Tukey 检验)。

2.2 玫烟色棒束孢菌株的菌落生长速率和产孢量

与球孢白僵菌相似,本研究中5株玫烟色棒束孢菌株的生长速率非常接近,彼此之间差异不显著(图2),10 d后菌落的直径和产孢量见表2,5个菌落的直径为37.8~39.6 mm,在产孢量方面,以B菌株的产孢量最多,为 $6.04 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$,其次是C菌株为 $2.63 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$,E菌株产孢量最少,为 $6.28 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ (表2)。

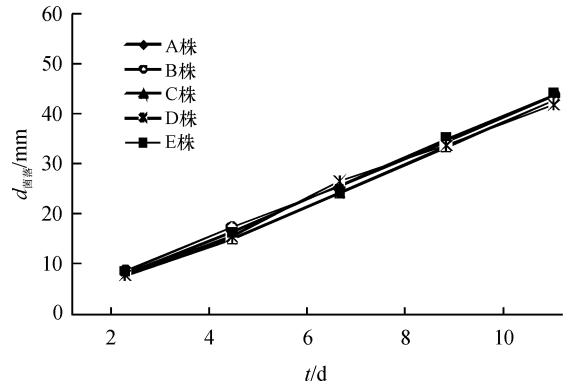


图2 玫烟色棒束孢的菌落生长速率

Fig. 2 The growth rates of different *Isaria fumosorosea* colonies

表2 各玫烟色棒束孢培养10 d后的菌落直径和产孢量¹⁾

Tab. 2 The colony diameters and sporulation of *Isaria fumosorosea* after 10 days growth

菌株	$d_{\text{菌落}}/\text{mm}$	产孢量/ $\times 10^7 \text{ mL}^{-1}$
A	$39.6 \pm 0.75\text{a}$	8.80bc
B	$38.6 \pm 0.51\text{a}$	60.40a
C	$38.8 \pm 2.01\text{a}$	26.30ab
D	$37.8 \pm 1.83\text{a}$	9.78bc
E	$39.4 \pm 0.75\text{a}$	6.28c

1) 同列数据后凡具有一个相同字母者,表示差异不显著($P > 0.05$, Tukey 检验)。

2.3 不同病原真菌菌株对柑橘木虱若虫的致病力

对柑橘木虱2~3龄若虫的致病力试验结果(表3)表明,5株球孢白僵菌与5株玫烟色棒束孢菌株均能感染柑橘木虱的低龄若虫,但感染7 d后,5株球孢白僵菌菌株对柑橘木虱若虫的致病率表现有差异,其中A菌株对木虱低龄若虫的侵染致死率最高(78.0%),其次是E菌株(77.0%),D菌株的侵染致死率最低(64.0%)。感染7 d后,5株玫烟色棒束孢对柑橘木虱的致死率也存在明显差异,以B菌株对柑橘木虱2~3龄若虫的致病力最高,侵染致死率达到81.0%,以D菌株对柑橘木虱若虫的致死率最低(52.0%)。

表3 不同病原真菌菌株对柑橘木虱低龄若虫7 d的死亡率¹⁾

Tab. 3 The mortality rates of *Diaphorina citri* nymphs seven days after infected with different strains of entomopathogenic fungal strains

菌株	球孢白僵菌	玫烟色棒束孢
A	$78.0 \pm 2.55\text{a}$	$69.0 \pm 5.10\text{ab}$
B	$72.0 \pm 3.74\text{a}$	$81.0 \pm 1.87\text{a}$
C	$74.0 \pm 7.31\text{a}$	$66.0 \pm 4.85\text{ab}$
D	$64.0 \pm 4.30\text{a}$	$52.0 \pm 8.60\text{bc}$
E	$77.0 \pm 3.39\text{a}$	$67.0 \pm 7.52\text{ab}$
CK	$29.0 \pm 1.87\text{b}$	$35.0 \pm 4.18\text{c}$

1) 同列数据后凡具有一个相同字母者,表示差异不显著($P > 0.05$, Tukey 检验)。

3 讨论与结论

自20世纪90年代中期以来,HLB先后对中国、美国、巴西等国的柑橘产业造成了毁灭性的危害^[9-11]。作为HLB唯一的自然传播媒介,柑橘木虱的防控至关重要^[12-13]。对柑橘木虱的防治多采用化学方法,然而化学农药的频繁使用带来了诸多负面问题,因此研发柑橘木虱的非化学防控成为研究热点,利用天敌昆虫、病原微生物控制柑橘木虱的研究也逐渐增多。

对于优良昆虫病原真菌的筛选,其菌落或菌丝的生长速率是一个重要评价指标。牡丹超等^[14]研究了柑橘木虱致病真菌淡紫拟青霉 ZJPL08 菌株的生物学特性,包括不同温度和培养时间对菌株生长和孢子萌发率的影响,研究结果表明,25~30℃是淡紫拟青霉菌丝的最佳生长温度,在PDA上培养10d后,菌落直径为5.5~6.0cm,其菌丝生长速率明显高于本研究中球孢白僵菌和玫烟色棒束孢的菌丝生长速率。致病力是衡量真菌菌株生物防治潜力的重要指标,也是评价菌株优劣的重要依据,昆虫病原真菌的不同菌株对目标害虫的致病性有着显著的差异,不仅不同地点、不同环境,即使在同一地点采集的同一真菌的不同菌株,在致病力方面也可能存在明显差异。Subandiyah等^[15]研究了玫烟色棒束孢不同浓度的孢子悬浮液对柑橘木虱的侵染效果,利用 $1 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ 的孢子浓度侵染6d后,柑橘木虱的死亡率达到55.6%;Hoy等^[16]报道了玫烟色棒束孢的1个菌株在 1×10^6 和 $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 孢子浓度下对柑橘木虱成虫的致死率均达到100%;本研究中,玫烟色棒束孢B菌株在 $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 的浓度侵染柑橘木虱低龄若虫7d后,后者的死亡率达到81.0%。以上结果表明,同一昆虫病原真菌不同菌株的毒力存在明显的差异,除此之外,防控效果的差异可能还与害虫地理种群、温湿度等环境因子以及真菌孢子制剂的施用方法有关。

优良菌株的筛选,通常以菌株的菌落生长速率、产孢量及致病力为指标综合考虑。在本研究中,综合上述3个性状指标,球孢白僵菌E菌株、玫烟色棒束孢B菌株可以作为柑橘木虱生物防治的优良真菌病原菌株,今后应进一步深入研究。通过对球孢白僵菌、玫烟色棒束孢菌株的遗传多样性、菌丝生长速度、产孢量、孢子大小和萌发率等生物学特性及对柑橘木虱的致病力的研究,可以更深入地了解到各病原菌株致病力差异及其与菌株的寄主种类、地理来源之间的关系,也可为柑橘木虱田间生物制剂的研

发与应用提供依据。

参考文献:

- [1] 黄金萍,黄建邦,高娃,等. 柑橘木虱取食黄龙病柑橘部位与获菌效率的关系[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(1):71-74.
- [2] 代晓彦,任素丽,周雅婷,等. 黄龙病媒介昆虫柑橘木虱生物防治新进展[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(3): 414-419.
- [3] 邓明学. 以控制木虱为重点的柑橘黄龙病综合防治技术研究[J]. 植物保护, 2006, 32(6): 147-149.
- [4] 刘宗庆. 桂北柑桔黄龙病发生流行及综合治理[J]. 广西园艺, 2006, 17(4): 6-7.
- [5] 叶志勇,於一敏,余继华. 柑橘木虱的发生及综合防治技术[J]. 浙江柑橘, 2006, 23(3): 28-30.
- [6] 熊红利,林云彪,项宇,等. 柑橘黄龙病与柑橘木虱在我国发生北界调查[J]. 植物检疫, 2011, 25(4): 79-80.
- [7] 牡丹超,鹿连明,胡秀荣,等. 淡紫拟青霉菌菌株的分离、鉴定及其对柑橘木虱的致病性[J]. 浙江农业学报, 2015, 27(3): 393-399.
- [8] 章玉苹,李敦松,黄少华,等. 柑橘木虱的生物防治研究进展[J]. 中国生物防治, 2009, 25(2): 160-164.
- [9] GOTTWALD T R. Current epidemiological understanding of citrus Huanglongbing [J]. Annu Rev Phytopathol, 2010, 48: 119-139.
- [10] HALBERT S E, MANJUNATH K L. Asian citrus psyllid (*Sternorrhyncha: Psyllidae*) and greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida[J]. Fla Entomol, 2004, 87(3):330-353.
- [11] YANG Y, HUANG M, BEATTIE G A, et al. Distribution, biology, ecology and control of the psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama, a major pest of citrus: A status report for China[J]. Int J Pest Manage, 2006, 52(4): 343-352.
- [12] HALBERT S E, NUNEZ C A. Distribution of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Rhynchota: Psyllidae) in the Caribbean basin [J]. Fla Entomol, 2004, 87(3): 401-402.
- [13] BOVE J M. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus [J]. J Plant Pathol, 2006, 88(1): 7-37.
- [14] 牡丹超,尤明其,胡秀荣,等. 柑橘木虱致病真菌淡紫拟青霉 ZJPL08 的生物学特性研究[J]. 浙江柑橘, 2014, 31(4):17-21.
- [15] SUBANDIYAH S, NIKOH N, SATO H, et al. Isolation and characterization of two entomopathogenic fungi attacking *Diaphorina citri* (Homoptera, Psylloidea) in Indonesia[J]. Mycoscience, 2000, 41(5): 509-513.
- [16] HOY M A, SINGH R, ROGERS M E. Evaluations of a novel isolate of *Isaria fumosorosea* for control of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) [J]. Fla Entomol, 2010, 93(1): 24-32.

【责任编辑 霍欢】

<http://xuebao.scau.edu.cn>