

DOI:10.16211/j.issn.1004-390X(n).2016.01.005

金龟子绿僵菌和球孢白僵菌对大黑鳃 金龟二龄幼虫的致病力*

柏波^{1#}, 郑亚强^{1#}, 刘思雨¹, 杜广祖¹, 肖关丽^{2**}, 陈斌^{1**}

(1. 云南农业大学 植物保护学院, 云南省微生物发酵工程研究中心, 云南 昆明 650201;
2. 云南农业大学 农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 为了筛选生物防治大黑鳃金龟 (*Holotrichia diomphalia* Batesa) 的高毒力生防虫生真菌, 室内生物测定和比较了金龟子绿僵菌 [*Metarhizium anisopliae* Metschnikoff (Sorokin)] KMa0107 菌株、球孢白僵菌 [*Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin] 菌株 Bb070610 和 Bb070917 对大黑鳃金龟 2 龄幼虫的致病力。结果表明: 接种后 5~12 d, KMa0107, Bb070610 和 Bb070917 菌株对大黑鳃金龟 2 龄幼虫的致死剂量对数值间差异显著 ($F = 19.45$, $P < 0.01$), 分别为 $(9.45 \pm 1.71) \sim (4.73 \pm 0.37)$ 、 $(9.76 \pm 1.87) \sim (5.20 \pm 0.79)$ 、 $(10.48 \pm 1.24) \sim (5.99 \pm 0.43)$ 。用密度为 $1.15 \times 10^8 \sim 1.15 \times 10^5$ 个/mL 的孢子悬浮液接种后, 对大黑鳃金龟 2 龄幼虫侵染致病的 LT_{50} 估计值范围为 5.7~8.7 d, 6.4~9.2 d, 6.3~8.6 d。接种孢子悬浮液后, 随着病原菌的侵染及其在虫体内的繁殖, 大黑鳃金龟 2 龄幼虫血淋巴中蛋白质质量浓度逐渐减少。接种后第 4 天, 幼虫血淋巴中蛋白质质量浓度均明显下降, 接种 KMa0107 及 Bb070610 的大黑鳃金龟 2 龄幼虫血淋巴蛋白质质量浓度下降速度显著大于 Bb070917 菌株处理。接种后第 10 天, 菌株 KMa0107 及 Bb070610 处理的大黑鳃金龟 2 龄幼虫血淋巴蛋白质质量浓度显著低于对照及 Bb070917 菌株处理 ($F = 17.36$, $P < 0.01$)。综合以上结果, 金龟子绿僵菌 KMa0107 及球孢白僵菌 Bb070610 菌株对大黑鳃金龟 2 龄幼虫具有较强的致病力, 具有良好的生防制剂开发潜力。

关键词: 大黑鳃金龟; 金龟子绿僵菌; 球孢白僵菌; 致病力; 血淋巴

中图分类号: S 433.5 文献标志码: A 文章编号: 1004-390X (2016) 01-0030-05

Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against the 2nd Instar Larva of *Holotrichia diomphalia* Batesa

BAI Bo¹, ZHENG Yaqiang¹, LIU Siyu¹, DU Guangzu¹, XIAO Guanli², CHEN Bin¹

(1. College of Plant Protection, Microorganism Fermentation Engineering Research Center, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. College of Agronomy and Bioscience, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: In order to screen higher virulent entomopathogenic fungus for the biocontrol of *Holotrichia diomphalia* Batesa, the virulence and effect on the protein content in the blood-lymph of the 2nd instar larva of *H. diomphalia* after inoculation of three entomopathogenic fungus KMa0107 of *Metarhizium anisopliae*, strain Bb070610 and Bb070917 of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin was tested in

收稿日期: 2014-10-07

修回日期: 2015-01-14

网络出版时间: 2016-01-15 15:05

* 基金项目: 中国烟草总公司云南省公司科技项目 (2014YN29); 云南省农业产业化专项 (2013 [364]); 国家自然科学基金项目 (30860005)。

作者简介: #对本文贡献等同, 为并列第一作者。柏波 (1993—), 男, 云南保山人, 在读本科生, 主要从事害虫综合防治研究。E-mail: 707435814@qq.com; 郑亚强 (1987—), 男, 贵州遵义人, 硕士研究生, 主要从事昆虫害虫病原体与害虫综合防治研究。E-mail: 736364746@qq.com

** 通信作者 Corresponding authors: 肖关丽 (1972—), 女, 云南昭通人, 博士, 教授, 主要从事作物生理研究。E-mail: glxiao9@163.com; 陈斌 (1970—), 男, 甘肃礼县人, 博士, 教授, 主要从事害虫综合防治研究。E-mail: chbins@163.com

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20160115.1505.006.html>

the laboratory. Results showed that the lethal dosage caused by KMa0107, Bb070610 and Bb070917 was significantly different, and the lethal time was also significantly different ($F = 19.45$, $P < 0.01$). The logarithmic value of LC_{50} was $(9.45 \pm 1.71) \sim (4.73 \pm 0.37)$, $(9.76 \pm 1.87) \sim (5.20 \pm 0.79)$, $(10.48 \pm 1.24) \sim (5.99 \pm 0.43)$ for strain KMa0107, Bb070610 and Bb070917, respectively. The LT_{50} ranged 5.7 ~ 8.7d, 6.3 ~ 8.6d, 6.4 ~ 9.2d and for *H. diomphalia* at the concentration of $10^5 \sim 10^8$ spores/mL. The content of the protein in the haemocytes decreased 4 d after inoculation, significantly lower than in the control, and the protein content in blood-lymph in the 2nd instar larvae after inoculation of strain KMa0107, Bb070610 was significantly lower than in the larvae after inoculation of strain Bb070917. Overall, strain KMa0107 of *M. anisopliae* and Bb070610 of *B. bassiana* showed high pathogenicity and with biocontrol potentiality against 2nd instar larva of *H. diomphalia*.

Keywords: *Holotrichia diomphalia* Batesa; *Metarhizium anisopliae* Metschnikoff (Sorokin); *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin; pathogenicity; blood-lymph

大黑鳃金龟 (*Holotrichia diomphalia* Batesa), 隶属鞘翅目鳃金龟科, 又称东北大黑鳃金龟, 成虫取食作物地上部分, 幼虫称为蛴螬, 生活周期较长, 食性杂, 危害隐蔽, 常造成多种作物、蔬菜及苗木缺苗断垄, 防治困难^[1-2]。长期以来, 利用化学药剂防治蛴螬引起的农药残留和环境污染日趋突出。随着人类对环境保护意识的提高, 利用微生物防治害虫已受到世界各国的普通重视, 虫生真菌因其具有杀虫的广谱性、流行性及对环境安全的特点, 在害虫生物防治研究与应用中倍受关注^[3-5], 金龟子绿僵菌对蛴螬类的致病性也一直是绿僵菌高效杀虫菌株筛选的重要内容^[6-9]。有关虫生真菌对大黑鳃金龟的毒力及应用研究已引起人们的重视^[10-11], 但研究报道较少。由此, 本研究主要测定了金龟子绿僵菌 [*Metarhizium anisopliae* Metschnikoff (Sorokin)] KMa0107 菌株和球孢白僵菌 Bb070610 和 Bb070917 菌株对大黑鳃金龟 2 龄幼虫的毒力, 同时还测定了接种后不同时段大黑鳃金龟幼虫血淋蛋白质质量浓度变化动态, 以期准确评价绿僵菌和球孢白僵菌菌株对大黑鳃金龟 2 龄幼虫的致病作用, 从而为筛选大黑鳃金龟幼虫生物防治用菌株提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫与菌株

从田间采集大黑鳃金龟成虫, 在室内利用罐头瓶 ($R = 7$ cm, $H = 10$ cm), 饲以马铃薯薯块, 获得龄期一致的 2 龄幼虫供试。供试菌株 KMa0107 为分离自罹病棕色金龟子 (*Holotrichia*

titanis Reitter) 幼虫体上的金龟子绿僵菌 [*M. anisopliae* Metschnikoff (Sorokin)], 菌株 Bb070610 和 Bb070917 均为球孢白僵菌, 分别分离自罹病鲜黄鳃金龟和甘薯小象甲成虫。

1.2 毒力测定

在萨氏培养基 (SDAY) 上培养供试菌株, 待大量产生分生孢子后, 取各菌株的分生孢子粉, 用加有 0.1% 吐温 - 80 湿润剂的 0.003 mol/L KH_2PO_4 缓冲液制成密度为 1.15×10^8 个/mL 的孢子悬浮液, 稀释成 1.15×10^7 、 1.15×10^6 、 1.15×10^5 、 1.15×10^4 、 1.15×10^3 个/mL 和 1.15×10^2 个/mL 密度梯度。先用 1.15×10^2 孢子/mL 浓度进行预备试验, 用浸渍法接种 3 种幼虫 30 头。处理后的幼虫置罐头瓶中的湿土内, 每个瓶中放置 1 头, 用马铃薯切片饲养, 定期观察和记录感病虫数^[19]。以无菌的吐温 - 80 液为对照。每天定时观察和记录大黑鳃金龟幼虫的感染死亡虫数, 连续观察直至无死亡个体出现。

1.3 接种后供试虫体血淋巴中蛋白质质量浓度的变化

采用考马斯亮蓝 G250 法测定虫体内不同时段内血淋巴中蛋白质质量浓度^[12]。从接菌处理后第 2 天开始, 每天取 5 头。在冰浴条件下剪开供试大黑鳃金龟幼虫腹足, 收集血淋巴于经提前冷冻且加有少许苯基硫脲的离心管中, 在 4 °C, 3000 r/min 条件下离心 3 min 以除去血细胞, 保存备用^[13]。

1.4 数据统计

利用 TDM 模型 (时间—剂量—死亡率模型) 处理生物测定数据, 采用 Duncan 检验分析各数据

的差异显著性，所有数据分析采用 DPS 软件^[14]。

2 结果与分析

2.1 累积死亡率

以 KMa0107、Bb070610 和 Bb070917 菌株低剂量 (10^2 孢子/mL) 接种处理作为预备试验，观察大黑鳃金龟 2 龄幼虫的死亡率。结果表明：接种 KMa0107、Bb070610 菌株后大黑鳃金龟 2 龄幼虫的感染累积死亡率均为 3.33%，而接种 Bb070917 菌株后供试虫体无死亡个体。因此，本研究中选用 $1.15 \times 10^3 \sim 1.15 \times 10^8$ 个/mL 孢子悬浮液测定致病力。

表 1 结果表明：供试 KMa0107、Bb070610 和

Bb070917 菌株对大黑鳃金龟 2 龄幼虫具有感染致病力，但各菌株的致病力间存在一定差异。用 KMa0107、Bb070610 和 Bb070917 菌株高浓度 1.15×10^8 个/mL 接种后 1~4 d，大黑鳃金龟 2 龄幼虫均无死亡个体。但到第 5 天时，3 菌株对大黑鳃金龟 2 龄幼虫侵染致病的校正死亡率达 50% 以上；其中，KMa0107 和 Bb070610 菌株侵染致病引起的死亡率明显高于菌株 Bb070917 ($F = 17.41, P < 0.01$)。随着接种后时间的延续，死亡率逐渐增加，到第 10 天时，供试验三菌株对大黑鳃金龟 2 龄幼虫侵染致病引起的校正死亡率均达 80% 以上。由此表明，供试菌株 KMa0107、Bb070610 对大黑鳃金龟 2 龄幼虫具有较强的致病力。

表 1 大黑鳃金龟 2 龄幼虫的校正死亡率

Tab. 1 The corrected mortality of 2nd larvae of *H. diomphalia* after the inoculation of three hyphomycetes entomopathogenic fungi strains

孢子密度/ (个 · mL ⁻¹) spore density/ (spores · mL ⁻¹)	接种后第 5 天的校正死亡率/% the corrected mortality of <i>H. diomphalia</i> on the 5 th day after inoculation			接种后第 12 天的校正死亡率/% the corrected mortality of <i>H. diomphalia</i> on the 12 th day after inoculation		
	KMa0107	Bb070610	Bb070917	KMa0107	Bb070610	Bb070917
	1.15×10^8	80.00 ± 4.36	76.67 ± 3.45	59.00 ± 3.37	80.00 ± 4.36	96.67 ± 6.35
1.15×10^7	60.00 ± 2.45	54.5 ± 3.65	46.67 ± 3.43	60.00 ± 2.45	90.00 ± 4.67	73.33 ± 3.62
1.15×10^6	46.67 ± 3.76	34.8 ± 4.32	40.00 ± 2.86	46.67 ± 3.76	76.67 ± 3.54	63.33 ± 4.28
1.15×10^5	34.6 ± 4.36	23.33 ± 2.26	26.67 ± 3.28	34.6 ± 4.36	53.33 ± 3.89	53.33 ± 5.87
1.15×10^4	16.67 ± 0.46	14.3 ± 2.65	3.33 ± 0.65	16.67 ± 0.46	30.00 ± 5.37	13.33 ± 3.26
1.15×10^3	3.33 ± 0.14	3.33 ± 0.45	0	3.33 ± 0.14	10.00 ± 5.29	6.67 ± 2.14

2.2 致死浓度与时间效应

接种后，从 3 株丝孢真菌对大黑鳃金龟 2 龄幼虫的致死浓度对数值结果 (表 2) 表明：供试的 3 株虫生真菌对大黑鳃金龟幼虫感染致

病的致死浓度间差异显著 ($F = 19.45, P < 0.01$)，且菌株 KMa0107 和 Bb070610 对大黑鳃金龟 2 龄幼虫的侵染致病作用大于 Bb070917 菌株。

表 2 3 株丝孢真菌对大黑鳃金龟 2 龄幼虫的致死剂量对数值

Tab. 2 Logarithmic value of LC₅₀ for 2nd larvae of *H. diomphalia* at different period after inoculation of 3 hyphomycetes entomopathogenic fungi strains

菌株 strain	不同时段内致死剂量对数值 logarithmic value of the LC ₅₀ at different period after inoculation							
	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d
KMa0107	9.45 ± 1.71	7.26 ± 1.43	6.23 ± 1.41	5.74 ± 0.64	5.20 ± 0.34	4.95 ± 0.27	4.81 ± 0.32	4.73 ± 0.37
Bb070610	9.76 ± 1.87	7.70 ± 1.31	6.54 ± 1.45	5.86 ± 0.54	5.46 ± 0.43	5.20 ± 0.79	5.20 ± 0.79	5.20 ± 0.79
Bb070917	10.48 ± 1.24	8.97 ± 0.56	7.51 ± 0.38	6.56 ± 0.21	6.33 ± 0.25	6.18 ± 0.32	6.06 ± 0.25	5.99 ± 0.43

对大黑鳃金龟 2 龄幼虫接种 3 株丝孢虫生真菌孢子悬浮液后，供试菌株对大黑鳃金龟 2 龄幼虫

的感染时间反应差异明显 ($F = 12.67, P < 0.05$)，各菌株在不同接种浓度下对大黑鳃金龟幼虫侵染致

病的时间效应随着接种浓度的增大而递减。在 $10^5 \sim 10^8$ 个/mL 接种浓度下, KMa0107 对大黑鳃金龟幼虫致死 LT_{50} 分别为 9.2、7.6、6.6、5.8 d, Bb070610 对大黑鳃金龟幼虫致死 LT_{50} 分别为 9.8、7.9、6.9、6.4 d, Bb070917 对大黑鳃金龟幼虫致死 LT_{50} 分别为 12.8、11.0、9.5、8.6 d。由此可看出: 用 KMa0107、Bb070610 和 Bb070917 菌株 $10^5 \sim 10^8$ 孢子/mL 接种处理大黑鳃金龟 2 龄幼虫后, 对该虫侵染致病的 LT_{50} 估计值范围分别为 9.2 ~ 5.8 d、9.8 ~ 6.4 d 和 12.8 ~ 8.6 d, 即表现为接种 KMa0107 和 Bb070610 菌株对大黑鳃金龟幼虫的侵染致病速度大于 Bb070917 菌株。

2.3 血淋巴蛋白质量浓度的变化

用 3 株丝孢虫生真菌孢子悬浮液接种大黑鳃金龟 2 龄幼虫后其体内蛋白质质量浓度变化动态结果表明: 接种后随着菌体在虫体内的生长发育和繁殖, 血淋巴中蛋白质质量浓度也随之减少 (图 1)。接种后 1~3 d, 经 3 株丝孢虫生真菌处理的大黑鳃金龟幼虫血淋巴中蛋白质质量浓度无明显变化; 从第 4 天开始, 接种处理的大黑鳃金龟幼虫体内血淋巴中蛋白质质量浓度均出现急剧下降, 显著低于对照。处理后第 5 天时, 接种 KMa0107、Bb070610 和 Bb070917 后的大黑鳃金龟血淋巴中蛋白质质量浓度分别 (53.90 ± 4.06)、(59.60 ± 3.65) 和 (66.80 ± 2.30) mg/mL; 处理后第 10 天时, 大黑鳃金龟 2 龄幼虫血淋巴中蛋白质量浓度降至 (29.73 ± 3.38)、(34.65 ± 3.37) 和 (41.29 ± 4.63) mg/mL, 差异显著 ($F = 16.36, P < 0.01$)。由此表明: 丝孢虫生真菌绿僵菌和白僵菌侵染 2 龄大黑鳃金龟幼虫后均会造成虫体内血淋巴中蛋白质质量浓度降低, 从而有利于侵染。

3 讨论

本研究发现供试的 3 株丝孢类虫生真菌对大黑鳃金龟 2 龄幼虫均具有一定的致死力, 接种 1.15×10^8 孢子/mL 绿僵菌 KMa0107 菌株或球孢白僵菌 Bb070610 菌株后, 第 12 天时校正死亡率均达 90% 以上, 接种球孢白僵菌 Bb070917 菌株后校正死亡率也达 80%。从死亡率来看, 均高于文献报道的卵孢白僵菌^[15]和绿僵菌菌株^[11]的致毒力。此外, 3 株菌对大黑鳃金龟 2 龄幼虫的致病力间存在差异, 其中绿僵菌 KMa0107 菌株与球孢白僵菌 Bb070610 菌株对大黑鳃金龟的致病力

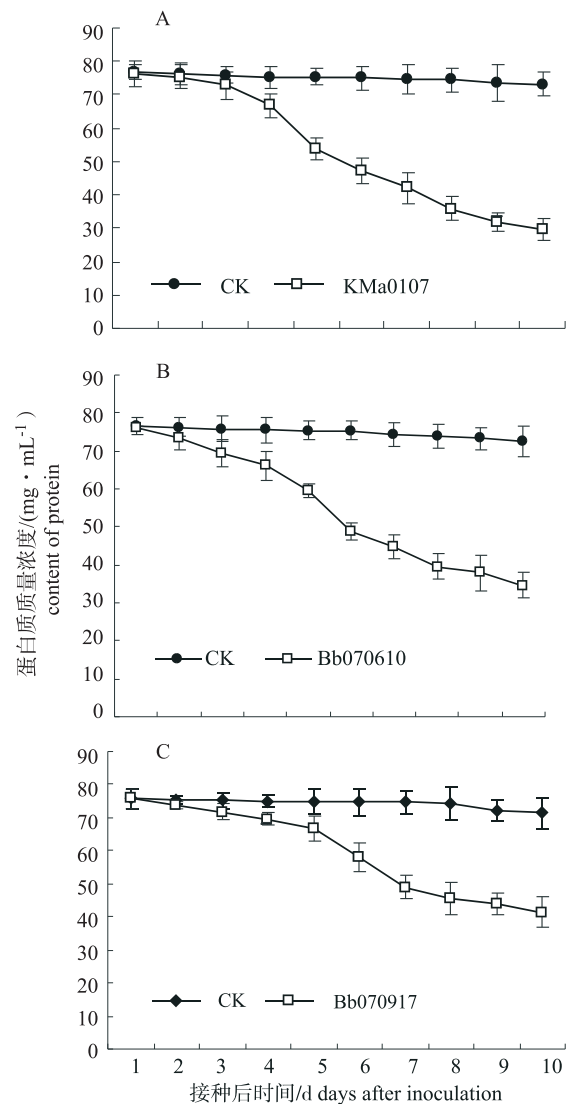


图 1 大黑鳃金龟幼虫血淋巴蛋白质质量浓度的变化
Fig. 1 Change of the protein content in blood-lymph of *H. diomphalia* after inoculation

高于球孢白僵菌 Bb070917, 究其原因可能与菌株种类及其分离寄主不同有关, 如供试绿僵菌 KMa0107 菌株分离自棕色金龟子 (*H. titanis* Reitter) 幼虫, 分离球孢白僵菌 Bb070610 菌株分离自鲜黄鳃金龟, 而球孢白僵菌 Bb070610 菌株则分离自甘薯小象甲。由此, 绿僵菌 KMa0107 菌株与球孢白僵菌 Bb070610 菌株均可用于大黑鳃金龟的生防制剂开发用菌株。

根据 3 株丝孢真菌对大黑鳃金龟 2 龄幼虫侵染致病的时间效应来看, 在 1.15×10^8 孢子/mL 接种浓度下其致死中时均在 5 d 以上, 明显大于化学农药对该虫的致死中时^[16-17]。因此, 在田间应用这些菌株防治大黑鳃金龟幼虫时, 应根据其

幼虫的发生时期提前用菌,以提高侵染致死率。此外,虫生真菌与有些化学农药或其他相容的治理手段相结合克服真菌效果慢的弱点^[18]。因此,还应加强对与供试菌株相容性增效剂的研究,以筛选出能缩短菌株对大黑鳃金龟幼虫侵染致病的时滞效应,从而提高致病速率。

虫生真菌感染昆虫最重要的生理病理变化是对血淋巴的影响,入侵到寄主昆虫血腔的真菌一般都能在血腔依靠血淋巴的成分增殖,使寄主昆虫出现生理饥饿而死亡^[18]。本研究中,用绿僵菌接种大黑鳃金龟 2 龄幼虫后,对其体内血淋巴蛋白质质量浓度具有明显的影响,该结果与 HUXHAM 等^[19]及陈斌等^[13]研究结果相同。同时,本研究发现,对大黑鳃金龟 2 龄接种后前 4 d,血淋巴中蛋白质质量浓度变化不明显,而从第 4 天开始则显著减少,表现为大黑鳃金龟 2 龄幼虫体内血淋巴蛋白质质量浓度的变化与接种后死亡率变化动态基本一致。综上所述,金龟子绿僵菌和球孢白僵菌对大黑鳃金龟具有明显的致病力。

[参考文献]

- [1] 张继祖,徐金汉. 中国南方地下害虫及其天敌 [M]. 北京:中国农业出版社,1996.
- [2] 魏鸿均,黄文琴. 中国地下害虫研究概述 [J]. 昆虫知识,1992,29(3):168.
- [3] LACEY L A, FRUTOS R, KAYA H K, et al. Insect pathogens as biological control agents: do they have a future? [J]. *Biological Control*, 2001, 21(3): 230.
- [4] VEGA F E, MEYLING N V, LUANGSARD J J, et al. *Fungal entomopathogens* [M] // *Insect Pathology*. 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press, 2012: 171.
- [5] WANG C S, FENG M G. Advances in fundamental and applied studies in China of fungal biocontrol agents for use against arthropod pests [J]. *Biological Control*, 2014, 68(1): 129.
- [6] 黄基荣,谢佩华,姚丽娟. 绿僵菌对金龟子的感病性试验 [J]. *生物防治通报*, 1994, 10(4): 175.
- [7] 陈祝安,黄基荣. 不同来源绿僵菌对云斑鳃金龟的致病力评价 [J]. *微生物学通报*, 1997, 24(2): 81.
- [8] MILNER R J, SAMSON P, MORTON R. Persistence of conidia of *Metarhizium anisopliae* in sugarcane fields: effect of isolate and formulation on persistence over 3–5 years [J]. *Biocontrol Science and Technology*, 2003, 13(5): 507.
- [9] 陈斌,邓裕亮,李正跃,等. 绿僵菌对小云斑鳃金龟毒力及在土壤中的宿存 [J]. *西南农业大学学报(自然科学版)*, 2005, 26(5): 580.
- [10] 张丽坤,李国勋,文景芝,等. 球孢白僵菌对东北大黑鳃金龟 (Coleoptera: Melolonthidae) 的侵染效果 [J]. *东北农业大学学报*, 1997, 28(3): 20.
- [11] 贾春生. 绿僵菌对东北大黑鳃金龟的时间—剂量—死亡率模型分析 [J]. *中国植保导刊*, 2005, 25(10): 11.
- [12] 李建武. *生物化学实验原理和方法* [M]. 北京:北京大学出版社,2002.
- [13] 陈斌,李正跃,和淑琪. 金龟子绿僵菌 KMa0107 菌株对三种玛绢金龟幼虫的致病力 [J]. *中国生物防治*, 2010, 26(1): 18.
- [14] 唐启义,冯明光. *实用统计分析及其 DPS 数据处理系统* [M]. 北京:科学出版社,2002.
- [15] 农向群,张爱文,邓春生. 卵孢白僵菌优良菌株的筛选和选育 [J]. *生物防治通报*, 1994, 10(1): 22.
- [16] 李耀发,高占林,党志红,等. 18 种杀虫剂对华北大黑鳃金龟和铜绿丽金龟的毒力比较 [J]. *植物保护科学*, 2008, 24(3): 296.
- [17] 刘艳涛,席国成,冯晓洁,等. 不同龄期大黑鳃金龟幼虫对两种剂型杀虫剂的敏感性测定 [J]. *北方园艺*, 2013(11): 113.
- [18] 蒲蜚龙,李增智. *昆虫真菌学* [M]. 合肥:安徽科学技术出版社,1996.
- [19] HUXHAM I M, LACKIE A M, MCCORKINDALE N J. Inhibitory effects of cyclodepsipeptides, destruxins, from the fungus *Metarhizium anisopliae*, on cellular immunity in insects [J]. *Journal of Insect Physiology*, 1989, 35(2): 97.