

滕忠才,张立红,刘廷辉,等.小菜蛾高毒力球孢白僵菌菌株抗旱性研究[J].江苏农业科学,2013,41(9):119-121.

小菜蛾高毒力球孢白僵菌菌株抗旱性研究

滕忠才^{1,3}, 张立红², 刘廷辉³, 董建臻³, 李瑞军³, 李保国³

(1. 保定学院生化系,河北保定 071000; 2. 河北省丰宁满族自治县职业技术教育中心,河北承德 068350;

3. 河北农业大学植物保护学院/河北省农作物病虫害生物防治工程技术研究中心,河北保定 071001)

摘要:通过对 8 株小菜蛾高毒力的球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)菌株的抗旱能力进行研究比较,发现 BD-B017、BD-B010 和 BD-B026 菌株的抗旱指标位居前列,最终得出防治小菜蛾最优的菌株是 BD-B010 和 BD-B026。菌株 BD-B010 和 BD-B026 在今后防治小菜蛾方面具有较大的开发应用价值。

关键词:小菜蛾;球孢白僵菌;抗旱性;萌发中时;生长量

中图分类号: S476;Q939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)09-0119-02

白僵菌作为一种重要的杀虫真菌,在国外已被开发成多种剂型并登记注册^[1-2]。随着近十多年来丝孢类生防真菌制剂技术的不断发展,长期困扰菌剂本身的生产、加工及应用的很多技术难题都被有效解决^[3-4],使得越来越多的球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)制剂被用于农林害虫的防治^[5]。虽然白僵菌能够寄生于多种昆虫,但不同菌株对寄主有一定的专化性,致病力也有一定的差异^[4],其致病力主要取决于菌株、害虫虫态以及环境条件等因素^[6]。

球孢白僵菌是白僵菌属中的一种,主要侵染鞘翅目、半翅目等绝大多数昆虫^[7],有效成分是具有细胞生命特征的侵染体(分生孢子或菌丝体)。白僵菌菌株的抗逆性在很大程度上决定着菌剂本身的生态适应性和田间应用效果。即使同一菌株在不同的寄主上也表现出不同的毒力。不同菌种或同一菌种的不同菌株在抗逆性方面往往存在较大的差异^[8]。因而,筛选高毒力且抗逆性强的菌株是提高生防菌剂技术含量和适用性的重要途径之一。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 小菜蛾高毒力菌株 BD-B007、BD-B008、BD-B001、BD-B021、BD-B010、BD-B029、BD-B017、BD-B026。

1.1.2 培养基 SDAY 固体培养基(4%葡萄糖、1%蛋白胨、1%酵母粉、2%琼脂);SDAY 液体培养基(4%葡萄糖、1%蛋白胨、1%酵母粉)。

1.2 方法

1.2.1 芽生孢子悬浮液的制备 用灭菌 0.05% Tween-80 收集芽生孢子,(25±1)℃下用 SDAY 液体培养基培养 7 d。用脱脂棉滤去菌丝等碎片,于 8 000 r/min 离心 10 min,弃上

清液。孢子用灭菌水洗涂 2 次,同上离心,调整至适当浓度备用。

1.2.2 8 株高毒力球孢白僵菌菌株萌发中时的测定 以 SDAY 液体培养基为基础培养基,加入 PEG200(聚乙二醇,分子量 6 000,质量百分含量为 10%),在(25±1)℃下培养 12 h,测其萌发中时 GT_{50}' ;以未加 PEG200 的菌液为对照,测其萌发中时 GT_{50} ;以经 PEG200 处理的萌发中时 GT_{50}' 与未经处理的萌发中时 GT_{50} 之差表示孢子耐干旱能力的大小。每次测定设 3 个重复(萌发液试管 3 支)。

1.2.3 8 株高毒力球孢白僵菌菌株萌发中浓度的测定 取孢子悬液,以 SDAY 液体培养基为基础培养基,加入 PEG200(质量百分含量为 5%、10%、20%、30%、40%),以未加 PEG200 处理为对照,在(25±1)℃下培养 10 h,测其萌发中浓度 GC_{50} 。每次测定设 3 个重复(萌发液试管 3 支)。

1.2.4 8 株高毒力球孢白僵菌菌株生长量的测定 取孢子悬液,以 SDAY 液体培养基为基础培养基,加入 PEG200(质量百分含量为 5%、10%、20%、30%、40%),以未加 PEG200 处理为对照,(25±1)℃下培养 12 h,8 000 r/min 离心 10 min,弃上清液。孢子用灭菌水洗涂 2 次,同上离心,用 0.05% Tween-80 分别配制成 1×10^6 个/mL 的悬液,然后用直径 5 mm 的滤纸圆片浸没于孢子悬液中,再取出置于直径 9 cm 的 SDAY 平板中央进行接种,置于(25±1)℃的培养箱中连续培养 7 d,每处理重复 3 次,逐日测量各平板上的菌落直径。

2 结果与分析

2.1 8 株高毒力球孢白僵菌菌株萌发中时的测定

由表 1 可知,经 PEG200 处理后,8 株球孢白僵菌菌株芽生孢子受干旱影响大小依次为 BD-B026 < BD-B017 < BD-B029 < BD-B010 < BD-B021 < BD-B001 < BD-B008 < BD-B007。其中 BD-B026 菌株的抗旱能力最强,对孢子的影响最小。BD-B017 菌株次之,BD-B007 菌株受影响最大。

2.2 8 株高毒力球孢白僵菌菌株萌发中浓度的测定

由表 2 可知,经 PEG200 处理后,8 株白僵菌菌株之间萌发中浓度大小依次为 BD-B026 > BD-B017 > BD-B029 > BD-B010 > BD-B021 > BD-B001 > BD-B008 > BD-B007。

收稿日期:2013-02-16

基金项目:河北省科技支撑计划(编号:12220302D)。

作者简介:滕忠才(1970—),男,河北献县人,硕士,讲师,主要从事农业昆虫与害虫综合防治研究。E-mail:teng-zhongcai@163.com。

通信作者:李瑞军,博士,副教授,主要从事害虫生物防治及农业生态安全研究。E-mail:li Ruijun99@sina.com。

表 1 不同菌株经 PEG 处理及未经 PEG 处理的萌发中时

菌株	GT ₅₀ '(h)	GT ₅₀ (h)	抗旱能力(h)
BD-B026	5.60±0.33fE	4.40±0.42eE	1.20
BD-B017	7.06±0.17deD	5.83±0.20cC	1.23
BD-B029	7.15±0.19dD	5.86±0.21cC	1.29
BD-B010	6.57±0.21eD	5.03±0.20cC	1.54
BD-B021	7.96±0.20cC	6.10±0.18dD	1.86
BD-B001	9.29±0.26bB	7.41±0.15bB	1.88
BD-B008	7.97±0.20cC	6.05±0.20cC	1.92
BD-B007	12.05±0.50aA	10.06±0.36aA	1.99

注:表中同列数据后不同大、小写字母分别表示差异极显著($P<0.01$)、显著($P<0.05$)。下表同。

表 2 不同菌株经 PEG 处理后萌发中浓度回归方程

菌株	GC ₅₀	回归方程($y=a+bx$)	r 值	95% 置信限(h)
BD-B026	16.12±0.02aA	$y=10.738\ 6-4.752\ 6x$	0.985 1	14.98~17.35
BD-B017	15.90±0.02aA	$y=8.705\ 0-3.083\ 7x$	0.945 0	14.42~17.52
BD-B029	15.57±0.02aAB	$y=8.379\ 4-2.834\ 2x$	0.866 3	13.97~17.36
BD-B010	13.60±0.02 bAB	$y=8.642\ 1-3.212\ 7x$	0.954 0	12.25~15.16
BD-B021	13.17±0.02bB	$y=9.572\ 1-4.084\ 0x$	0.990 6	12.10~14.33
BD-B001	8.87±0.03cC	$y=7.568\ 8-2.709\ 4x$	0.956 4	7.86~10.01
BD-B008	7.00±0.03cdC	$y=7.836\ 2-2.736\ 3x$	0.937 5	5.92~8.33
BD-B007	6.73±0.03dC	$y=7.477\ 2-2.991\ 3x$	0.987 5	6.00~7.55

表 3 不同含量 PEG 处理的 8 株白僵菌菌落直径

菌株	不同含量 PEG 处理的菌落直径(cm)					
	0%	5%	10%	20%	30%	40%
BD-B008	2.60±0.15aA	2.60±0.09aA	2.51±0.04abA	2.46±0.02aA	2.30±0.15aA	2.25±0.14aA
BD-B001	2.52±0.03aA	2.52±0.06aA	2.46±0.08aA	2.41±0.19aA	2.21±0.03abA	2.16±0.08aA
BD-B010	2.40±0.03aA	2.45±0.03aA	2.33±0.07abA	2.38±0.09aA	2.32±0.07aA	2.15±0.08aA
BD-B021	2.43±0.13aA	2.40±0.07aA	2.33±0.08bA	2.25±0.13aAB	2.18±0.10abA	2.08±0.12abA
BD-B029	2.53±0.02aA	2.45±0.03aA	2.4±0.05abA	2.35±0.03aA	2.10±0.13abA	2.00±0.11abA
BD-B026	2.03±0.02bB	2.02±0.06 bB	2.0±0.06cB	1.98±0.05bB	1.97±0.04bA	1.86±0.02bA
BD-B017	1.77±0.04cBC	1.77±0.03bcBC	1.75±0.03 dC	1.60±0.03cC	1.50±0.04cB	1.47±0.06cB
BD-B007	1.50±0.03dC	1.53±0.07cC	1.50±0.09eD	1.45±0.05cC	1.37±0.04cB	1.23±0.06cB

3 结论与讨论

水分活度(相对湿度除以 100 就等于水分活度)是指在天然或人为环境中微生物可实际利用的自由水或游离水的含量。水分活度除了限制微生物毒素的产生外,还是衡量微生物忍受干燥程度和能力的指标^[9]。因此选择抗干旱能力强的菌株防治目标害虫可以提高白僵菌的杀虫效果。抗旱力研究结果表明,总体上讲,随着水分活度降低,发芽率下降,菌株抗旱能力减弱,反之则抗旱能力增强。由研究结果可知,菌株 BD-B026 抗旱能力最强,BD-B007 菌株抗旱能力最弱,菌株 BD-B029 和 BD-B021 的抗旱能力处于中等水平,说明菌株 BD-B026 孢子的萌发率受相对湿度影响最小,菌株 BD-B007 孢子的萌发率受相对湿度影响最大。

通过对 8 株白僵菌菌株抗旱性的研究可知,不同菌株间抗旱性存在显著差异,同一菌株对不同条件的抗旱性也不相同。因此,在虫生真菌的生产过程中,筛选优良的菌株,不仅可有效提高菌剂的质量,而且可以提高真菌制剂在田间的应用效果^[10];白僵菌孢子的稳定性除与湿度有关外,还与孢子自身有关^[11]。在进行抗性育种工作和环境监测时,必须考虑这些因素,从而可以有效地预测孢子在环境中的宿存时间和

其中 BD-B026 菌株的抗旱能力最强,萌发中浓度最高;BD-B017 菌株次之,BD-B007 最低。

2.3 8 株高毒力球孢白僵菌菌株生长量的测定

由表 3 可知,不同含量 PEG200 处理对菌落直径产生的影响随 PEG200 处理含量增加而增大。当 PEG200 含量为 20% 时,各菌株与未经 PEG200 处理的差异显著($P<0.05$);当 PEG200 含量为 40% 时,各菌株与未经 PEG200 处理的差异极显著($P<0.01$)。其中 40% PEG200 对各菌株菌落生长的抑制率依次为 BD-B029>BD-B001>BD-B008=BD-B021>BD-B017>BD-B007>BD-B010>BD-B026,各菌株生长抑制率差异不显著(数据未列出)。

数量^[12],为防治策略的制定提供理论参考依据。

通过对 8 株白僵菌菌株的抗旱能力进行全面的比较,结果发现 BD-B017、BD-B026 和 BD-B010 菌株的抗旱力综合评价位居前列。综合考虑 8 株球孢白僵菌菌株的抗旱性以及几种昆虫的致病力,与其他菌株比较,球孢白僵菌菌株 BD-B010 和 BD-B026 具有较高的开发潜力,可以进行田间药效试验,以进一步确定其使用价值。

参考文献:

[1]Feng M G,Poprawski T J,Khachatourians G G. Production of formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control:current status[J]. Biocontr Sci Technol,1994,4(1):3-34.

[2]李增智. 菌物在害虫、植病和杂草治理中的现状和未来[J]. 中国生物防治,1999,15(1):35-40.

[3]Feng M Q,Poprawski T J,Khachatourians G G. Production of formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control:current status[J]. Biocontrol Sci Technol,1994,4:3-34.

[4]Butt T M,Jackson C,Magan N. Fungi as biocontrol agents:progress, problems and potential[M]. London:CAB International,2001:253-287.

王晓敏,张燕,龚德勇. 贵州续随子主要病害病原菌的分离鉴定[J]. 江苏农业科学,2013,41(9):121-122.

贵州续随子主要病害病原菌的分离鉴定

王晓敏,张燕,龚德勇

(贵州省亚热带作物研究所,贵州兴义 562400)

摘要:通过柯赫氏法则,采用组织分离法结合病原菌显微镜形态观察,对在贵州栽培种植的续随子发生的立枯病、褐斑病及灰霉病病原菌进行鉴定。结果表明,立枯病病原菌为木贼镰孢菌[*F. equiseti* (Corda) Sacc.],褐斑病病原菌为假尾孢属(*Pseudocercospora spegazzini*)真菌,灰霉病病原菌为灰葡萄孢真菌(*B. cinerea* Pers.)。

关键词:续随子;病害;病原菌;鉴定

中图分类号:S435.671 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)09-0121-02

续随子(*Euphorbia lathyris* L.),又叫千金子、小巴豆。为大戟科大戟属植物,在全国多个地区均有分布,可作为中药治疗小便不通、水肿等病症。近几年研究发现,续随子种子含油率达 45% 以上,提取的油脂以 C₁₆、C₁₈ 脂肪酸为主,与理想柴油替代品的分子组成相类似,是一种理想能源作物^[1]。

贵州亚热带作物研究所通过对续随子环境适应性、生物学特性及栽培技术等一系列的研究发现,续随子在贵州的生长环境为海拔 400~2 000 m,年均温 14~20℃ 的地区。但受高温高湿气候条件的影响,续随子在整个生育期均可发生病害。一般发病率 10%~15%,严重的高达 30%~40%。经调查,初步确定有立枯病、褐斑病、灰霉病等病害^[2-5]。但对这几种病害的病原菌种类尚不明确,为了有效控制续随子病害的发生及蔓延,本研究采用常规组织分离法结合病原菌形态观察,对续随子病害的病原菌进行分离、鉴定。

1 材料及方法

1.1 材料

供试续随子病样采集于贵州亚热带作物研究所兴义续随子种植试验基地。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)。

1.2 病菌的分离培养与纯化

按常规组织分离法进行病菌分离,分离病原菌前准备好已经滴入 1~2 滴 25% 乳酸溶液 PDA 平板。采回发病植株,选取发病部位,用自来水冲洗干净,取病健交界处病斑组织数小块(3~5 mm),在无菌条件下先放入 70% 乙醇浸泡 10 s 再转移至 0.1% 升汞 2~3 min 浸泡进行消毒处理,经无菌水洗 3 次后移入 PDA 平板上,PDA 平板置 25℃ 培养箱培养,定期观察记载,并及时对分离组织长出的菌落进行纯化培养。

1.3 致病性测定

按柯赫氏法则,将分离纯化后得到的病原菌菌落转接斜面培养基进行扩大培养。待分生孢子大量产生后用无菌水配成孢子悬浮液,用小型喷雾器将孢子悬浮液喷洒在健康续随子的叶片正背面,使其充分湿润,喷毕立即放入人工气候箱进行保温(25~30℃)保湿(99%)培养直至出现初期症状,试验设喷清水作对照,并作相同管理。接种后,每天对植株发病情况进行观察记载,出现典型症状后,取发病部位进行再分离,并与原接种菌比较。

1.4 病原菌鉴定

将菌株接种于 PDA 平板,放入 25~30℃ 恒温条件下培养,待菌落长成后,观察菌落颜色、形状、气生菌丝的疏密程度等;产孢后在显微镜下观察其产孢结构及分生孢子的形态,并用带测微尺的显微镜测量分生孢子大小等。并取子实体进行显微镜观察,根据其形态特征和测量结果,参照文献[6],进行病原菌鉴定。

2 结果与分析

2.1 立枯病症状及病原菌特征

病害症状:续随子立枯病发病期主要在播种出苗至开花

收稿日期:2013-03-11

基金项目:贵州省农业科学院研究生创新基金[编号:黔农科合(创新基金)2010014号];贵州省科研院所创新能力建设项目[编号:黔科合院所创能(2010)4007号]。

作者简介:王晓敏(1982—),女,贵州安顺人,助理研究员,主要从事特种油料植物创新利用研究。E-mail:wxmgzu@163.com。

[5] Roberts D W, St Leger R J. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects[J]. Adv Appl Microbiol, 2004, 54: 1-70.

[6] 蒲蛰龙. 害虫生物防治的原理和方法[M]. 北京: 科学出版社, 1978.

[7] 蒲蛰龙. 昆虫病理学[M]. 广州: 广东科学技术出版社, 1994: 348-356.

[8] 徐庆丰. 白僵菌的防虫作用及其在应用上的一些问题[J]. 昆虫知识, 1964, 8(6): 296-299.

[9] 关志苗. 水分活度及其在水产食品保藏上的意义[J]. 水产科学, 1996, 15(2): 35-37.

[10] 田甜, 李瑞军, 陆秀君, 等. 保定蝗区土壤绿僵菌对飞蝗高毒力菌株的筛选[J]. 植物保护, 2009, 35(5): 65-69.

[11] 张立红, 李瑞军, 陆秀君, 等. 对张北小菜蛾高毒力白僵菌菌株的筛选[J]. 植物保护, 2009, 35(1): 121-123.

[12] 孙鹏飞, 陈斌, 李正跃, 等. 球孢白僵菌不同菌株生物学特性及对小菜蛾的毒力研究[J]. 云南农业大学学报, 2007, 22(5): 635-638, 644.