

李 静,马 媛,赵 洪,等. 白僵菌孢子悬液添加促进剂对茶毛虫幼虫侵染的对比试验[J]. 江苏农业科学,2016,44(7):170-172.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.046

白僵菌孢子悬液添加促进剂对茶毛虫幼虫侵染的对比试验

李 静,马 媛,赵 洪,向 旭

(黔南民族师范学院生命科学系,贵州都匀 558000)

摘要:将 15% 乙醇、2% 吐温、2.5% 肥皂水分别添加进 5 个浓度梯度的白僵菌孢子悬液进行对比试验。结果表明:添加促进剂能使茶毛虫幼虫半数死亡时间提前,添加 15% 乙醇提前 10 d、添加 2% 吐温提前 7 d、添加 2.5% 肥皂水提前 7 d。根据以上结果可知,对比添加乙醇最好,但考虑添加的量和成本问题,添加肥皂水最经济。

关键词:白僵菌;孢子;茶毛虫;半数死亡时间

中图分类号: S435.711 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)07-0170-02

白僵菌(*Beauveria bassiana*)是昆虫病原真菌之一,遍布全世界,寄主范围广,是用于生物防治的真菌,近年来较多应用在蝗虫、松毛虫、玉米螟等重大害虫的防治上^[1]。白僵菌杀虫机理是其孢子接触害虫后产生芽管,芽管分泌一种溶解几丁酶,溶解虫体表面的几丁质后进入虫,芽管不断生长伸入虫体内壁,并伸长变为菌丝,不但吸取虫体的水分和养分而不断生长、伸长、分枝、增殖,扰乱虫体的新陈代谢,直到整个虫体充满菌丝而死亡^[2]。采用白僵菌制成的杀虫剂对人、畜无毒,对作物安全,无残留、无污染,对鳞翅目、鞘翅目、同翅目等昆虫有毒害作用,是一类比较理想的绿色环保型生物杀虫剂^[3-4]。

茶毛虫是茶树的主要害虫之一,主要危害茶树的是幼虫,茶毛虫的幼虫取食是茶树的叶片,大量发生时将茶树芽叶、嫩梢、树皮咀食殆尽,严重影响茶叶的产量和茶树的长势^[5]。长期以来茶毛虫的发生产生危害时还是以化学防治为主,农药残留严重影响和制约了茶叶的产业发展,寻找一种高效、无污染、无农药残留、无副作用的新技术防控茶毛虫对茶叶的危害,是目前茶树病虫害防治中的重要工作之一。

在白僵菌的前期研究中发现,白僵菌侵染茶毛虫到致死所需要的时间较长,采用紫外线诱变,筛选优良菌株效果不理想。白僵菌杀虫见效慢,是白僵菌用作生物农药的瓶颈,因此本研究采用在白僵菌孢子悬液里添加促进剂,以期缩短侵染时间,提高死亡率,为白僵菌对茶毛虫的生物防治提供了一些参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种 白僵菌由黔南民族师范学院生命科学系微生物实验室从白僵蚕分离得到。

1.1.2 供试虫源 在贵州省都匀毛尖茶茶园基地采集到茶毛虫 1 龄幼虫。

1.2 方法

1.2.1 昆虫饲养 采集 1 龄幼虫,放入广口瓶中,瓶口用纱布封口,纱布上放 3 层湿面纱,瓶内放蘸湿的棉花保湿,每瓶加入 3~5 张鲜叶为饲料,瓶内叶片大多被食用时,及时去除残片,加入新叶。培养瓶放在温度 23.5℃ 左右、相对湿度 70%~80%、光—暗周期 12 h—12 h 的光照培养箱中培养^[6],培养到 3 龄幼虫,用于后面的试验。

1.2.2 菌种活化 采用灭菌 PDA 培养基上,在超净工作台,接种白僵菌在平板培养基中,将平板培养基放入 26℃ 的恒温箱中进行培养;培养 7~10 d 后,白僵菌长满整个平板后备用。

1.2.3 孢子悬液的制备 在长满白僵菌的平板上加入 10 mL 的无菌水,用无菌棉花过滤,滤液用 5 000 r/min 的离心机清洗 3 次。采用平板计数法计数清洗后的孢子悬液浓度为 2.97×10^8 CFU/mL,采用浓度梯度法配制 2.97×10^7 、 2.97×10^6 、 2.97×10^4 、 2.97×10^2 CFU/mL 共 5 个浓度梯度的孢子悬液。

1.2.4 孢子悬液的侵染方法 取 6 个直径为 120 mm 的培养皿,分别放入 20 头茶毛虫 3 龄幼虫,在饲养方法不变的条件下,利用注射器分别用以上 5 种浓度梯度的白僵菌孢子悬液喷水到虫体上,并用无菌水作空白对照,每天喷雾 1 次,连续喷雾 3 d,然后观察茶毛虫的活动状况。

1.2.5 添加促进剂在孢子悬液的方法 按 15% 乙醇、2% 吐温、2.5% 肥皂水,分别添加进 5 个浓度梯度的白僵菌孢子悬液,用以上孢子悬液的侵染方法感染茶毛虫,观察茶毛虫的死亡情况。

2 结果与分析

2.1 茶毛虫幼虫(茶毛幼)形态特点及生活习性观察

2.1.1 茶毛幼形态特点 1 龄幼虫体长为 2 mm 左右,淡黄褐色,体被褐色短毛和黄色长毛,到 5~7 龄时,虫体长 18~26 mm,体色均为黄褐色。

2.1.2 茶毛幼生活习性 茶毛虫幼虫共有 6~7 个龄期,每年发生 3~4 代^[7]。(1)群集性:1~2 龄幼虫时,群集性强,几十头至百余头幼虫聚集在茶叶的背面取食。3 龄幼虫开始分

收稿日期:2015-06-09

基金项目:贵州省教育厅自然科学项目(编号:黔科教 2010097)。

作者简介:李 静(1968—),女,重庆人,教授,主要从事微生物教学及研究。E-mail:dylinjing@126.com。

群,10 头至几十头不等群集,移动时,1 头带头迁移,后面的紧追不舍。人为地将它们在同一饲养装置中分散,约 20 min 后它们又群聚在一起。到 5 龄幼虫以后,个体各自分散行动。(2)取食性:1~2 龄幼虫聚集在茶叶的背面,仅啃食叶的下表皮和叶肉,使叶片呈薄膜状,3 龄幼虫,开始叶片全食,造成叶片大面积缺口,到 5 龄幼虫以后,各自寻找食物,叶片全食,吃光 1 张,再移 1 张。(3)取食时间:在野外茶毛幼在 08:00 左右开始取食,在 10:00 左右停止,中途因为天气热,就爬到周围较阴凉的杂草中躲藏;下午在 17:00 左右,出现在茶叶上取食。在室内培养,一般 08:00—11:00 取食,中途到茶叶背面躲藏,不取食,到 16:00—19:00 取食,晚上也到背面躲藏,不取食。

2.2 不同浓度孢子悬液的白僵菌对茶毛幼触杀的影响

采用 5 个浓度梯度的孢子悬液和 1 个空白对照,对每组 20 头茶毛幼进行喷洒触杀,15 d 后有虫死亡。

由表 1 和图 1 可知,白僵菌孢子浓度在 2.97×10^8 CFU/mL 时,茶毛幼半数致死时间最短,需要 20 d,随着孢子浓度降低,半数死亡时间延长,致死率也逐渐降低。白僵菌浓度在 2.97×10^4 、 2.97×10^2 CFU/mL 时,死亡率达不到 100%。

表 1 不同浓度的白僵菌孢子悬液侵染茶毛虫的死亡情况

| 饲养时间 (d) | 不同浓度孢子悬液下茶毛虫的死亡数(头) | | | | | |
|-------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-----|
| | 2.97×10^8 | 2.97×10^7 | 2.97×10^6 | 2.97×10^4 | 2.97×10^2 | 对照 |
| | CFU/mL | CFU/mL | CFU/mL | CFU/mL | CFU/mL | |
| 15 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 18 | 2 | 1 | 2 | 1 | 0 | 1 |
| 19 | 4 | 4 | 4 | 1 | 1 | 0 |
| 20 | 4 | 2 | 1 | 3 | 1 | 0 |
| 21 | 7 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 22 | 1 | 1 | 5 | 2 | 3 | 0 |
| 23 | 0 | 6 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| 24 | 0 | 1 | 2 | 3 | 0 | 0 |
| 25 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| 26 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| 27 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 28 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 死亡率 | 100% | 100% | 100% | 85% | 50% | 10% |

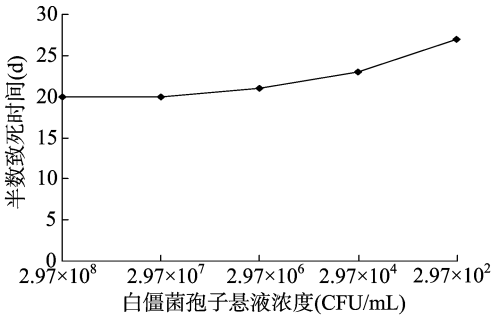


图1 未添加处理半数致死时间

2.3 不同浓度白僵菌孢子悬液添加 15% 乙醇对茶毛幼触杀的影响

添加 15% 乙醇到 5 个浓度梯度的孢子悬液和 15% 乙醇作为空白对照,对每组 20 条茶毛幼进行喷洒触杀,2 d 后有虫

死亡。

根据表 1 和表 2、图 2 的数据对比,添加 15% 乙醇茶毛幼杀虫半数致死时间提前了 10 d,添加乙醇的白僵菌孢子随着浓度的降低需要的半数死亡时间延长;在 5~8 d 时,茶毛幼死亡数都为 0,说明前期茶毛幼死亡是由乙醇导致的。

表 2 不同浓度的白僵菌孢子悬液加 15% 乙醇侵染茶毛虫的死亡数

| 饲养时间 (d) | 不同浓度孢子悬液下茶毛虫的死亡数(头) | | | | | |
|-------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-----|
| | 2.97×10^8 | 2.97×10^7 | 2.97×10^6 | 2.97×10^4 | 2.97×10^2 | 对照 |
| | CFU/mL | CFU/mL | CFU/mL | CFU/mL | CFU/mL | |
| 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 3 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | 3 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 |
| 10 | 4 | 5 | 4 | 1 | 0 | 0 |
| 11 | 2 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 8 | 6 | 5 | 3 | 2 | 0 |
| 13 | 0 | 1 | 3 | 7 | 3 | 1 |
| 14 | 0 | 1 | 0 | 2 | 4 | 1 |
| 15 | 0 | 0 | 2 | 3 | 0 | 0 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 死亡率 | 100% | 100% | 100% | 100% | 75% | 35% |

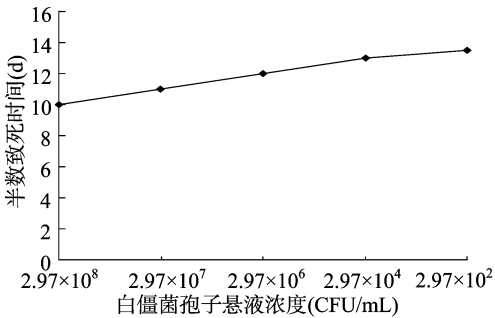


图2 添加15%乙醇处理的半数致死时间

2.4 不同浓度白僵菌孢子悬液添加 2% 吐温对茶毛幼触杀的影响

添加 2% 吐温到 5 个浓度梯度的孢子悬液和 2% 吐温作为空白对照,对每组 20 条茶毛幼进行喷洒触杀,11 d 后有虫死亡。

根据表 3、图 3 和表 1 的数据对比,添加 2% 吐温白僵菌孢子悬液茶毛幼杀虫半数致死时间提前了 7 d,添加吐温的白僵菌孢子随着浓度的降低半数致死时间延长;茶毛幼死亡时间集中在 15~16 d,死亡较为集中整齐。

2.5 不同浓度白僵菌孢子悬液添加 2.5% 肥皂水对茶毛幼触杀的影响

添加 2.5% 肥皂水到 5 个浓度梯度的孢子悬液和 2.5% 肥皂水作为空白对照,对每组 20 条茶毛幼进行喷洒触杀,12 d 后有虫死亡。

表3 不同浓度白僵菌孢子悬液加2%吐温侵染茶毛虫的死亡数

| 饲养时间 (d) | 不同浓度白僵菌孢子悬液加2%吐温下的死亡数(头) | | | | | 对照 |
|-------------|--------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|----|
| | 2.97 × 10 ⁸ | 2.97 × 10 ⁷ | 2.97 × 10 ⁶ | 2.97 × 10 ⁴ | 2.97 × 10 ² | |
| | CFU/mL | CFU/mL | CFU/mL | CFU/mL | CFU/mL | |
| 11 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 3 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | 7 | 0 | 0 | 2 | 2 | 1 |
| 14 | 3 | 6 | 4 | 0 | 3 | 0 |
| 15 | 1 | 5 | 4 | 1 | 2 | 0 |
| 16 | 5 | 5 | 1 | 4 | 2 | 0 |
| 17 | 1 | 0 | 3 | 3 | 0 | 0 |
| 18 | 0 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 19 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| 20 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 21 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 22 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 |
| 23 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 死亡率 | 100% | 100% | 95% | 75% | 60% | 5% |

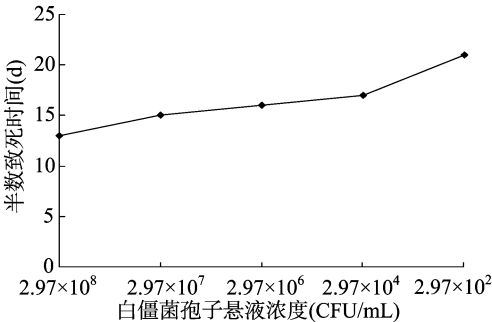


图3 添加2%吐温处理的半数致死时间

根据表4、图4和表1的数据对比,添加2.5%肥皂水白僵菌孢子悬液茶致死毛幼杀虫半数时间提前了7 d,随着孢子浓度的降低,致死率也逐渐降低。茶毛幼死亡时间集中在15~18 d。

表4 不同浓度的白僵菌孢子悬液加2.5%肥皂水侵染茶毛虫的死亡数

| 饲养时间 (d) | 死亡数(条) | | | | | 对照 |
|-------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----|
| | 2.97 × 10 ⁸ | 2.97 × 10 ⁷ | 2.97 × 10 ⁶ | 2.97 × 10 ⁴ | 2.97 × 10 ² | |
| | CFU/mL | CFU/mL | CFU/mL | CFU/mL | CFU/mL | |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 14 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 5 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 16 | 4 | 3 | 5 | 0 | 3 | 0 |
| 17 | 1 | 3 | 1 | 4 | 3 | 0 |
| 18 | 1 | 5 | 2 | 3 | 1 | 0 |
| 19 | 2 | 0 | 3 | 0 | 1 | 1 |
| 20 | 2 | 3 | 0 | 2 | 2 | 0 |
| 21 | 0 | 1 | 2 | 2 | 0 | 0 |
| 22 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 23 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 死亡率 | 100% | 100% | 85% | 70% | 65% | 10% |

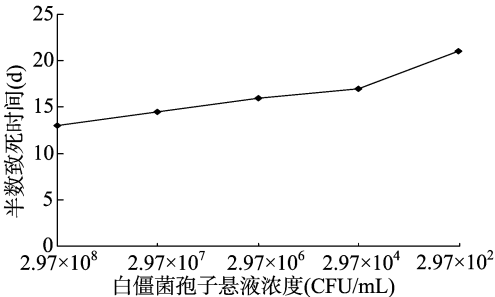


图4 添加2.5%肥皂水处理的半数致死时间

3 结论与讨论

3.1 结论

茶毛虫具有年幼时聚集在一起、成虫时分开的特性,取食时具有早晚阴凉时取食、中午为避开炎热躲藏起来的特性。茶毛幼随着白僵菌孢子浓度降低需要的半数死亡时间逐渐延长;并随着孢子浓度的降低,致死率也逐渐降低。

添加促进剂能使茶毛幼半数致死时间提前,添加15%乙醇提前10 d、添加2%吐温提前了7 d、添加2.5%吐温提前了7 d。根据以上对比添加乙醇最好,但考虑添加的量和成本问题,添加肥皂水最经济。

白僵菌孢子浓度在2.97 × 10⁸、2.97 × 10⁷、2.97 × 10⁶ CFU/mL时,茶毛幼死亡率均为100%,2.97 × 10⁸、2.97 × 10⁷ CFU/mL侵染茶毛幼差异明显,建议孢子浓度在2.97 × 10⁷个/mL较为适宜。

3.2 讨论

添加促进剂15%乙醇2 d就能使茶毛幼死亡,与未添加的相比时间提前13 d,但在5~8 d时死亡率都为0,根据空白对照可知,15%乙醇就可以使茶毛幼死亡,所以确定白僵菌致死茶毛幼需要的时间是实际提前9 d,比不添加促进的白僵菌提前6 d,促进作用还是很明显。

添加乙醇有促进白僵菌致死茶毛幼的作用,可能是因为乙醇有渗透作用,促进白僵菌孢子进入茶毛幼基体内,白僵菌在虫体内生长;而吐温和肥皂水都是表面活性剂,由于白僵菌孢子悬液进入虫体较困难,一是虫体表面被毛,二是表面有活性张力,而吐温和肥皂水都有降低表面活性张力的作用,促进白僵菌孢子进入虫体,白僵菌在虫体萌发生长,达到致死茶毛幼的作用,促进作用较乙醇差一些。

参考文献:

[1] 谭济才. 茶树病虫害防治学[M]. 北京:中国农业出版社,2002.
[2] 季香云,杨长举. 白僵菌的致病性与应用[J]. 中国生物防治, 2003,19(2):82-85.
[3] 林海萍,韩正敏,张 昕,等. 球孢白僵菌研究现状及提高其杀虫效果展望[J]. 浙江林学院学报,2006,23(5):575-580.
[4] 徐婉清. 白僵菌生物特性及防治研究[J]. 绿色科技,2010(5):122-123.
[5] 姚 渭. 茶毛虫产卵规律的研究[J]. 西北农业大学学报,1993,23(3):224-229.
[6] 唐美君,殷坤山,郭华伟,等. 茶毛虫实验种群生命表[J]. 植物保护,2012,38(2):127-129.
[7] 韦玲长. 夏茶期间茶树主要害虫的发生与防治[J]. 临沧科技, 2003(4):41.