

陶淑霞, 陆子慧. 大豆食心虫高毒力球孢白僵菌菌株的筛选[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(5): 91–93.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.05.024

# 大豆食心虫高毒力球孢白僵菌菌株的筛选

陶淑霞, 陆子慧

(吉林农业大学农学院, 吉林长春 130118)

**摘要:**筛选对大豆食心虫 (*Leguminivora glycinivorella*) 具有高毒力且生物学性状优良的球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 菌株, 选择分离自大豆食心虫老熟幼虫的 8 个球孢白僵菌菌株, 在对各菌株生物学性状研究的基础上, 进一步对大豆食心虫老熟幼虫的毒力进行测定。生物学性状研究表明, 菌株 Cc-2、Cc-3 和 Mdj-3 具有生长速度快、萌发率高、产孢能力强、胞外蛋白酶产酶水平高等优良性状。毒力测定结果表明, 菌株 Cc-2 对大豆食心虫老熟幼虫的校正死亡率为 92.55%, 侵染率为 90.00%, 致死中时 (median lethal time, 简称 LT<sub>50</sub>) 为 6.54 d。菌株 Cc-2 不仅对大豆食心虫致病力最高, 其致病速率也最快, 结果表明, 菌株 Cc-2 在大豆食心虫的生物防治中有重要的应用价值。

**关键词:**大豆食心虫; 球孢白僵菌; 生物学性状; 毒力; 菌株筛选

**中图分类号:** S435.651 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)05-0091-03

大豆食心虫 (*Leguminivora glycinivorella*) 为单食性害虫, 主要危害大豆, 分布于我国东北、华北及山东等地, 以东北三省危害严重, 主要为幼虫蛀荚危害, 常年蛀食率为 10%~20%, 严重时蛀食率为 30%~40%, 严重影响大豆的产量和品质<sup>[1]</sup>。初孵幼虫在豆荚上爬行数小时后, 钻入豆荚进行危害, 发育至老熟幼虫后脱荚, 钻入土中越冬, 大豆食心虫的整个世代只有很短时间是暴露在外的, 因此防治非常困难。目前, 主要是在成虫发生盛期以菊酯类药剂防治大豆食心虫<sup>[2-3]</sup>。

球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 是害虫微生物防治中一种重要的虫生真菌, 可侵染 15 个目的昆虫和一些螨类, 具有分布范围广、侵染力强、易于形成真菌流行病等特点, 因此被认为是具有开发潜力的生防真菌<sup>[4-5]</sup>。球孢白僵菌不同菌株对目标害虫的毒力存在着显著差异<sup>[6-8]</sup>。

球孢白僵菌是大豆食心虫幼虫的寄生性病原真菌, 自然寄生率为 5%~10%, 是造成大豆食心虫自然死亡的主要因素之一<sup>[9]</sup>。为提高球孢白僵菌对大豆食心虫老熟幼虫的防

治效果, 须要筛选对此虫具有高毒力的菌株。本研究采集自然球孢白僵菌菌株, 并对其生物学性状、毒力等指标进行比较研究, 旨在筛选出生物学性状优良, 且对大豆食心虫老熟幼虫具有高毒力的菌株, 以期对大豆食心虫的生防技术提供指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株及培养基

供试菌株分别采自吉林省长春市、黑龙江省哈尔滨市和牡丹江地区的大豆食心虫越冬幼虫, 采集后进行分离与纯化。马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (potato dextrose agar, 简称 PDA; 配方为 200 g 马铃薯, 30 g 葡萄糖, 20 g 琼脂, 10 g 酵母, 1 000 mL 蒸馏水)。萨氏培养基 (sabouraud dextrose agar with yeast extract, 简称 SDAY; 配方为 40 g 葡萄糖, 20 g 琼脂, 10 g 酵母, 10 g 蛋白胨, 1 000 mL 蒸馏水)。萨氏液体培养基 (sabouraud dextrose with yeast extract, 简称 SDY; 配方为 40 g 葡萄糖, 10 g 酵母, 10 g 蛋白胨, 1 000 mL 蒸馏水)。供试菌株的寄主昆虫及采集地点如表 1 所示。

### 1.2 供试昆虫

在吉林农业大学大豆中心收集自然脱荚的大豆食心虫老熟幼虫, 选取发育整齐一致的幼虫作为供试昆虫。

### 1.3 菌落生长性状观察

分别取各分离菌株平板上的孢子粉, 配制浓度为 1.0 ×

收稿日期: 2016-09-28

基金项目: 吉林省教育厅项目 [编号: 2013(55) 号]。

作者简介: 陶淑霞 (1973—), 女, 吉林长春人, 博士, 副教授, 主要从事昆虫生理生化与害虫生物防治研究。E-mail: tsx9@163.com。

[8] 闫丽英, 庞保平, 周晓榕, 等. 南美斑潜蝇对不同菜豆品种的偏好性与寄主化学物质含量的关系[J]. 中国农业科学, 2008, 41(3): 713–719.

[9] 高俊平, 庞保平, 刘 慧, 等. 南美斑潜蝇对番茄的选择性与叶毛数和营养物质含量的关系[J]. 植物保护, 2006, 32(2): 25–28.

[10] 戴小华, 朱朝东, 徐家生, 等. 寄主植物叶片物理性状对潜叶昆虫的影响[J]. 生态学报, 2011, 31(5): 1440–1449.

[11] 卢 伟, 侯茂林, 文光辉, 等. 植物挥发性次生物质对植食性昆虫的影响[J]. 植物保护, 2007, 33(3): 7–11.

[12] 路贵和, 刘学义, 张学武. 不同抗旱类型大豆品种气孔特征初探[J]. 山西农业科学, 1994, 22(4): 8–11.

[13] Schoonhoven L M, van Loon J J A, Dicke M. Plants as insect food: not the ideal[M]//Insect-plant biology. London: Chapman and Hall, 1998: 83–120.

[14] 曹 宇, 鄧军锐, 从春蕾, 等. 西花蓟马寄主选择性与寄主物理性状及次生物质的关系[J]. 植物保护, 2012, 38(4): 27–32.

[15] 汤德良, 王武刚, 裴鑫德. 棉花品种次生代谢物质含量差异对棉铃虫生长的影响[J]. 植物保护, 1996, 22(4): 6–9.

[16] 张继红, 王琛柱. 棉铃虫幼虫对氨基酸糖类和棉花次生物质的取食[J]. 植物保护, 2001, 27(1): 3–5.

[17] 杨 朗, 黄凤宽, 曾 宁, 等. 水稻挥发性次生物质对褐飞虱寄主定向及生长的影响[J]. 生态学报, 2009, 29(9): 5106–5114.

表 1 供试菌株的寄主昆虫和采集地点

菌株	寄主	采集地点
Cc-1	大豆食心虫	吉林省长春市
Cc-2	大豆食心虫	吉林省长春市
Cc-3	大豆食心虫	吉林省长春市
Mdj-1	大豆食心虫	黑龙江省牡丹江市
Mdj-2	大豆食心虫	黑龙江省牡丹江市
Mdj-3	大豆食心虫	黑龙江省牡丹江市
Heb-1	大豆食心虫	黑龙江省哈尔滨市
Heb-2	大豆食心虫	黑龙江省哈尔滨市

$10^7$  个/mL 的孢子悬浮液。取 5  $\mu$ L 孢子悬浮液接在含有 PDA 培养基的培养皿中,重复 3 次,于 25  $^{\circ}$ C 条件下培养,观察并记录各菌株菌落的形态,在第 14 天时测量各菌株菌落的直径。

1.4 产孢量测定

在各菌株培养至第 14 天时,用打孔器(直径为 10 mm)在菌落半径 1/2 处打孔取菌块,每个菌株重复 3 次,将菌块置于三角瓶中,加入 20 mL 0.05% 吐温-80 溶液,充分搅拌得到孢子悬浮液,利用血球计数板对孢子悬浮液进行观察计数。

1.5 孢子萌发率测定

分别取各菌株平板培养的分生孢子适量,加入 20 mL SDY 培养基中,配制浓度为  $1.0 \times 10^6$  个/mL 的孢子悬浮液,在 25  $^{\circ}$ C,130 r/min 条件下培养 24 h 后,吸取 20  $\mu$ L 菌液滴在血球计数板上,置于显微镜下,观察并记录孢子的萌发情况,芽管长度大于或等于孢子直径的孢子视为萌发<sup>[10]</sup>。

1.6 胞外蛋白酶含量测定

平板由质量体积比为 1.0% 的明胶和质量体积比为 1.5% 的琼脂配成。各菌株分别配制浓度为  $1 \times 10^8$  个/mL 孢子悬浮液,各取 10  $\mu$ L 滴于平板中心,每个菌株重复 3 次,于 25  $^{\circ}$ C 条件下培养 4 d 后,将 15% 的 HgCl<sub>2</sub> 溶液倒入平板。在垂直 2 个方向分别测量透明环直径和菌落直径,以两者比值作为胞外蛋白酶产酶量的指示值。

1.7 毒力测定

1.7.1 菌土的制备 选取生物学性状良好的 3 个菌株(Cc-2、Cc-3、Mdj-3)用于毒力测定。将 3 个菌株的孢子悬浮液均匀涂在 SDAY 培养皿中,于 25  $^{\circ}$ C 条件下培养 10 d,取 0.5 mg 孢子粉,加入 50 mL 0.05% 吐温-80 溶液中,配制成孢子悬浮液,在显微镜下测定该孢子悬浮液的浓度,计算出 1 g 孢子粉所含的孢子数。称取孢子粉与灭菌土(过 50 目筛)充分混匀,配制成含孢子数为  $1.0 \times 10^7$  个/g 的菌土,备用。

1.7.2 测定方法 取灭过菌的土壤并将其配制成含水量为 20% 的土壤,盛于塑料杯(8 cm  $\times$  12 cm)中,然后在表面均匀洒上配制的菌土(以未施用菌土为 CK),每杯接入 20 头供试昆虫,待幼虫入土后,置于温度为 25  $^{\circ}$ C 条件下培养,每个菌株设 3 个重复,在接种后第 4、6、8、10 天进行调查,计算不同时间的死亡率、校正死亡率、侵染率和致死中时(median lethal time,简称 LT<sub>50</sub>)。

1.8 数据分析

采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析,用单因素方差分析(One-Way ANOVA)检验各菌株生物学性状及其对大豆食

心虫毒力的差异显著性( $P < 0.05$ ),用回归分析的 Probit 分析供试菌株对大豆食心虫的致死中时(LT<sub>50</sub>)。

2 结果与分析

2.1 不同菌株菌落形态分析

在 PDA 培养基上不同菌株的菌落形态存在较大的差异。由表 2 可知,菌株 Cc-2、Cc-3、Mdj-1、Mdj-3 和 Heb-1 均属薄粉状菌落,孢子层厚且产孢早;菌株 Cc-1 属绒毛状菌落,即菌丝生长速度快,但产孢量少;菌株 Mdj-2、Heb-2 均属毡状菌落,产孢量介于薄粉状和绒毛状之间。

表 2 各菌株在培养基上的形态特征

菌株	菌落类型	菌落色泽	菌落形态	基质色泽
Cc-1	绒毛状	乳白略带点黄	绒毛状	黄色
Cc-2	薄粉状	乳白略黄	薄粉状	黄色
Cc-3	薄粉状	白色	薄粉状	黄褐色
Mdj-1	薄粉状	乳白略黄	薄粉状	黄色
Mdj-2	毡状	白色	毡状	黄色
Mdj-3	薄粉状	白色	薄粉状	黄褐色
Heb-1	薄粉状	白色	薄粉状	黄色
Heb-2	毡状	白色	毡状	黄褐色

2.2 不同菌株生长速率、产孢量、孢子萌发率的比较分析

由表 3 可知,不同菌株的生长速度存在显著差异( $F_{7,23} = 218.09, P < 0.0001$ )。菌株 Cc-1 营养生长最快,第 14 天时菌落直径达 61.66 mm,其次是菌株 Cc-3、Mdj-3、Cc-2,菌落直径分别为 59.36、54.18、52.14 mm,菌株 Heb-2 营养生长最慢,第 14 天时菌落直径为 28.36 mm。各菌株的产孢量差异显著( $F_{7,23} = 40.77, P < 0.0001$ )。菌株 Cc-2、Cc-3 和 Mdj-3 的产孢量较大,分别为  $1.26 \times 10^8$ 、 $1.14 \times 10^8$ 、 $1.32 \times 10^8$  个/mL,菌株 Cc-1 的产孢量最低,为  $0.27 \times 10^8$  个/mL。各菌株的萌发率也存在显著差异( $F_{7,23} = 11.03, P < 0.0001$ ),菌株 Cc-2、Cc-3 和 Mdj-3 的萌发率较高,分别为 96.01%、93.74%、95.17%。

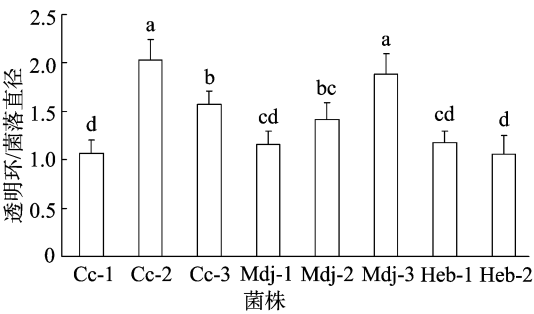
表 3 各菌株菌落直径、产孢量及萌发率

菌株	菌落直径 (mm)	产孢量 ( $\times 10^8$ 个/mL)	萌发率 (%)
Cc-1	61.66 $\pm$ 1.64a	0.27 $\pm$ 0.02f	87.43 $\pm$ 1.12e
Cc-2	52.14 $\pm$ 0.90b	1.26 $\pm$ 0.10ab	96.01 $\pm$ 1.58a
Cc-3	59.36 $\pm$ 1.12a	1.14 $\pm$ 0.12bc	93.74 $\pm$ 1.77abc
Mdj-1	42.23 $\pm$ 1.84c	1.01 $\pm$ 0.10cd	88.13 $\pm$ 1.36de
Mdj-2	39.05 $\pm$ 1.58d	0.85 $\pm$ 0.07d	90.84 $\pm$ 1.66cd
Mdj-3	54.18 $\pm$ 1.01b	1.32 $\pm$ 0.06a	95.17 $\pm$ 2.34ab
Heb-1	39.93 $\pm$ 1.52cd	1.06 $\pm$ 0.17c	92.68 $\pm$ 2.14bc
Heb-2	28.36 $\pm$ 0.81e	0.53 $\pm$ 0.07e	89.36 $\pm$ 1.08de

注:同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。下表同。

2.3 不同菌株的胞外蛋白酶活性比较分析

由图 1 可知,培养 96 h 后各菌株胞外蛋白酶产生水平有显著差异( $F_{7,23} = 15.13, P < 0.0001$ )。菌株 Cc-2 和 Mdj-3 产酶量较高,产酶水平分别为 2.03、1.88,两者差异不显著;其次是菌株 Cc-3,产酶水平为 1.57,其他菌株的胞外蛋白酶产酶量较低。



柱上不同小写字母表示在0.05水平上差异显著  
图1 不同菌株在明胶平板上胞外蛋白酶产生水平

表 4 不同菌株对大豆食心虫老熟幼虫的毒力分析

菌株	供试幼虫 (头)	死亡率 (%)				校正死亡率 (%)	侵染率 (%)	LT <sub>50</sub> (d)
		第 4 天	第 6 天	第 8 天	第 10 天			
Cc-2	60	3.33 ± 2.89a	45.00 ± 5.00a	83.33 ± 5.77a	93.33 ± 5.77a	92.55 ± 6.45a	90.00 ± 5.00a	6.54
Cc-3	60	1.67 ± 2.89b	35.00 ± 5.00ab	70.00 ± 5.00b	78.33 ± 7.64b	75.88 ± 7.69b	75.00 ± 5.00b	7.39
Mdj-3	60	0.00	28.33 ± 5.77b	58.33 ± 5.77c	61.67 ± 2.89c	58.80 ± 2.96c	58.33 ± 2.89c	8.30
CK	60	0.00	0.00	0.00	3.33 ± 2.89	—	0.00	0.00

3 讨论

不同来源的球孢白僵菌具有明显的寄主专化性<sup>[11]</sup>。姚剑等通过测定球孢白僵菌对马尾松毛虫 (*Dendrolimus punctatus*) 和淡色库蚊 (*Culex pipiens pallens*) 的毒力,确定不能用球孢白僵菌对淡色库蚊的毒力测定来代替对马尾松毛虫的毒力测定,验证了其寄主专化性的存在<sup>[12]</sup>。可见,应用白僵菌防治害虫最重要的是筛选对靶标害虫致病力强的菌株。

刘玉军等筛选了对栎旋木柄天牛 (*Aphrodisium sauteri*) 高致病力 Bb202 菌株,该菌株产孢能力强且孢子萌发速度快<sup>[6]</sup>。张海剑等通过测定不同球孢白僵菌菌株对二点委夜蛾 (*Athetis lepigone*) 的毒力,筛选出毒力较强的 Ed-41 菌株,该菌株具有生长快、孢子萌发速率高、产孢量大等优良性状<sup>[7]</sup>。结果表明,对大豆食心虫高致病力的菌株具有良好的生物学性状,可见,球孢白僵菌的生物学指标与菌株的致病力具有明显的相关性。

虫生真菌的蛋白降解酶能够分解寄主昆虫体壁中的蛋白质,有利于真菌穿透寄主体壁形成侵染<sup>[13-14]</sup>。冯明光发现,不同球孢白僵菌菌株胞外蛋白酶的产生量与供试昆虫的死亡率呈显著正相关关系<sup>[15]</sup>。结果表明,对大豆食心虫致病力强的菌株,其胞外蛋白酶的产生水平也较高。本研究中筛选的 Cc-2 菌株具有营养生长快、孢子萌发率高、产孢能力强且对大豆食心虫具有高毒力的特点,可作为防治大豆食心虫的生防菌株。

参考文献:

[1] 林汉明,常汝镇,邵桂花,等. 中国大豆耐逆研究[M]. 北京:中国农业出版社,2009:278-281.  
[2] 季宏平. 几种新药剂防治大豆害虫效果及其评价[J]. 大豆科学,2002,21(1):78-80.  
[3] 王克勤,李新民,刘春来,等. 大豆食心虫危害高峰期和最佳防治时期研究[J]. 作物杂志,2006(5):57-58.  
[4] 林乃铨. 害虫生物防治[M]. 北京:科学出版社,2010,238.

2.4 不同菌株对大豆食心虫的毒力分析

在上述研究的基础上,决定选取生物学性状优良的菌株 Cc-2、Cc-3 和 Mdj-3 进行致病力测定。由表 4 可知,不同菌株之间对大豆食心虫的校正死亡率 ( $F_{2,8} = 22.05, P = 0.002$ ) 和侵染率 ( $F_{2,8} = 38.71, P < 0.0001$ ) 有显著差异,其中菌株 Cc-2 对大豆食心虫毒力最强,施药后第 10 天校正死亡率高达 92.55%,侵染率为 90.00%,致死中时 LT<sub>50</sub> 为 6.54 d。

[5] Feng M G, Poprawski T J, Khachatourians G G. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status[J]. Biocontrol Science and Technology, 1994, 4(1): 3-34.  
[6] 刘玉军,张龙娃,何亚琼,等. 栎旋木柄天牛高毒力球孢白僵菌菌株的筛选[J]. 昆虫学报,2008,51(2):143-149.  
[7] 张海剑,石洁,郭宁,等. 二点委夜蛾幼虫高毒力球孢白僵菌菌株筛选与生物学特性初步研究[J]. 中国生物防治学报,2012,28(3):439-443.  
[8] 李银平,雷仲仁,王海鸿. 对西花蓟马高效的球孢白僵菌菌株筛选及产孢特性研究[J]. 中国生物防治学报,2013,29(2):219-226.  
[9] 徐庆丰,冯真,马淑丽. 应用白僵菌 [*Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.] 防治大豆食心虫 (*Grapholitha glycinivorella* Mats.) 初步研究[J]. 昆虫学报,1959,9(3):203-217.  
[10] Hong T D, Gunn J, Ellis R H, et al. The effect of storage environment on the longevity of conidia of *Beauveria bassiana*[J]. Mycological Research, 2001, 105(5):597-602.  
[11] 李增智,黄勃,陈名君,等. 分子时代的白僵菌研究[J]. 菌物学报,2011,30(6):823-835.  
[12] 姚剑,李增智,樊美珍,等. 球孢白僵菌菌株寄主专化性的研究[C]//中国菌物学会虫生真菌专业委员会,中国科学院微生物研究所. 中国虫生真菌研究与应用:4. 北京:中国农业科学技术出版社,1997.  
[13] Wang C S, Hu G, Leger R J S. Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudate and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation[J]. Fungal Genetics and Biology, 2005, 42(8):704-718.  
[14] Robert A, Messing - Al - Aidroos K. Acid production by *Metarhizium anisopliae*: effects on virulence against mosquitoes and on detection of in vitro amylase, protease, and lipase activity[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1985, 45(1):9-15.  
[15] 冯明光. 胞外蛋白酶和脂酶活性作为球孢白僵菌毒力指标的可靠性分析[J]. 微生物学报,1998,38(6):461-467.