低温对球孢白僵菌生物学特性及其对韭蛆毒力的影响

周仙红[1]， 范晓杰[1]， 曹 雨[2]， 张思聪[1]， 庄乾营[1]， 于 毅[1*]

（1. 山东省农业科学院植物保护研究所，济南 250100；2. 山东农业大学生命科学学院，泰安 271018）

摘要 本文室内测试了低温对球孢白僵菌高毒力菌株 YB8 的生物学特性（菌落生长速率与产孢量）及其对韭蛆毒力的影响。结果表明：在 8～25℃温度范围内菌落生长速率和产孢量随温度的降低而降低。在 25℃时菌落生长速率为 3.15 mm/d，产孢量为 5.94×10^6 个/mm^2。20、23℃下菌落生长速率（1.94、2.91 mm/d）与 25℃下相比显著降低（$P<0.05$），产孢量（4.80×10^6、5.57×10^6 个/mm^2）略有降低，差异不显著（$P>0.05$），8～17℃下与 25℃相比菌落生长速率及产孢量均显著降低（$P<0.05$）。低温下球孢白僵菌对韭蛆的校正死亡率随温度降低而减小，25℃时韭蛆校正死亡率最高，为 45.33%，与其他各温度差异显著（$P<0.05$）。因此低温对白僵菌生长和韭蛆致病力有显著影响，根据韭蛆的田间发生规律，建议春秋季节韭蛆盛发期使用球孢白僵菌防治韭蛆时应在土壤温度接近或达到 25℃时使用。

关键词 球孢白僵菌； 韭蛆； 低温； 菌落生长； 毒力

中图分类号： S 476 **文献标识码：** A **DOI：** 10.16688/j.zwbh.2017140

Effects of low temperature on the biological characteristics of *Beauveria bassiana* and its toxicity against *Bradysia odoriphaga*

ZHOU Xianhong[1]， FAN Xiaojie[1]， CAO Yu[2]， ZHANG Sicong[1]， ZHUANG Qianying[1]， YU Yi[1]

（1. *Institute of Plant Protection*, *Shandong Academy of Agricultural Sciences*, *Jinan* 250100, *China*; 2. *College of Life Sciences*, *Shandong Agricultural University*, *Tai'an* 271018, *China*）

Abstract The effects of low temperature on the biological characteristics (colony growth rate and spore yields) of high-virulence strain *Beauveria bassiana* YB8 and its toxicity against *Bradysia odoriphaga* were investigated. The results showed that the colony growth rate and spore yields decreased with decreasing temperature in the range of 8－25℃. The highest colony growth rate (3.15 mm/d) and spore yields (5.94×10^6 spores/ mm^2) were recorded at 25℃. The colony growth rates at 20℃ and 23℃ (1.94, 2.91 mm/d) were significantly lower than that at 25℃ ($P<0.05$), while the spore yields (4.80×10^6, 5.57×10^6 spores/mm^2) had no significant difference from that at 25℃ ($P>0.05$). The colony growth rate and spore yields in the range of 8－17℃ were significantly lower than those at 25℃ ($P<0.05$). Meanwhile, the toxicity of YB8 to *B. odoriphaga* decreased with decreasing temperature. The highest mortality (45.33%) was recorded at 25℃, which was significantly higher than those at other temperatures ($P<0.05$). Based on the occurrence of *B. odoriphaga* in the field, it was recommended to use *B. bassiana* in spring and autumn when the soil temperature was close to or above 25℃.

Key words *Beauveria bassiana*; *Bradysia odoriphaga*; low temperature; colony growth; toxicity

韭菜迟眼蕈蚊 *Bradysia odoriphaga* Yang *et* Zhang，属于双翅目，长角亚目，眼蕈蚊科，迟眼蕈蚊属，是葱蒜类蔬菜的重要害虫，幼虫俗称韭蛆，喜食韭菜根部。韭菜迟眼蕈蚊在田间以幼虫（韭蛆）为害，春季主要为害植株叶鞘、幼茎和芽，引起幼茎腐烂、叶片枯黄，而后把茎咬断并蛀入茎内。夏季气温较高，幼虫向下活动，深入鳞茎，造成鳞茎腐烂引起整株死亡。冬季气温低，韭菜迟眼蕈蚊以老熟幼虫

收稿日期： 2017－04－12 **修订日期：** 2017－07－12
基金项目： 国家公益性行业（农业）科研专项（201303027）；山东省自然科学基金（ZR2014CQ049）
* 通信作者 E-mail：robertyuyi@163.com

越冬[1]。环境,如温度、湿度、降水、寄主植物的品种及覆盖面积是影响昆虫发生发展的主要因素,其中温度和湿度对韭菜迟眼蕈蚊影响较大,适度低温和高湿对其生存有利,而过高温度和湿度或低温、低湿可降低其存活率[2]。冯惠琴等[3]、梅增霞等[4]研究发现20～25℃下韭菜迟眼蕈蚊的种群增长指数和繁殖力较高,说明该温度范围是韭菜迟眼蕈蚊的适宜生长温度,这就是该虫春、秋季发生重的原因之一。

球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 属于丝孢纲,丛梗孢目,丛梗孢科,白僵菌属,是一种能寄生 15 目 149 科 700 多种昆虫和蜱螨类的广谱性的昆虫病原真菌[5],因此其被公认为目前世界上防治害虫应用较广、最有前途的一种虫生真菌[6]。虫生真菌在其生产过程和田间应用中会受到温度、湿度、光照等环境因素影响[7],温度影响球孢白僵菌孢子萌发、菌丝生长、产孢繁殖各个生长阶段。球孢白僵菌孢子萌发的温度范围为 5～35℃[8-9],生长速度一般随温度的升高而加快,温度过低对球孢白僵菌的产孢量影响不大,但容易造成孢子萌发时间推迟、菌丝生长稀疏[10-11]。室内外研究发现,适宜球孢白僵菌孢子萌发及菌丝生长的温度,也是防治害虫的最佳温度,低温(17℃以下)或高温时(29℃以上)会抑制球孢白僵菌生长,导致其杀虫效果显著降低[12-16]。由于春、秋季是韭蛆为害高峰期,而夏季几乎不发生,因此本文选取实验室储存的对韭蛆致病力强的球孢白僵菌菌株 YB8,研究低温对球孢白僵菌生物学特性的影响,同时室内测定了低温下 YB8 对韭蛆的毒力,旨在为指导田间使用球孢白僵菌防治韭蛆的温度范围提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料

供试菌株:球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 自亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 上分离获得,经筛选后获得对韭蛆高毒力菌株 YB8。菌株保存于山东省农业科学院植物保护研究所 4℃冰箱中。使用前用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)在恒温箱中培养形成菌落,培养条件为温度(25±1)℃,光周期 L//D=0 h//24 h。

供试昆虫:韭菜迟眼蕈蚊 *Bradysia odoriphaga* Yang *et* Zhang 采自山东寿光韭菜田,并于山东省农业科学院植物保护研究所养虫室内用人工饲料[17]连续饲养多代,饲养条件为温度(25±1)℃,相对湿度 70%±5%。试验选用健康活泼的 3 龄幼虫。

1.2　试验方法

1.2.1　低温对球孢白僵菌菌株 YB8 的菌落生长速率和产孢量的影响

将球孢白僵菌在 PDA 培养基上活化 10 d 左右,用直径 5 mm 的灭菌打孔器在菌落边缘打取菌饼,转接到 PDA 平板中央,分别置于不同温度(8、11、14、17、20、23 和 25℃)恒温箱中黑暗培养,每处理 5 个重复。采用十字交叉法[12]测量菌落直径,每 24 h 测定 1 次,共测量 10 d,计算菌落生长速率。10 d 后用直径 5 mm 的灭菌打孔器从菌落中心距离边缘 1/2 处打取菌饼,每个处理取 3 个菌饼,接入 15 mL 含 0.05%吐温－80 的无菌水中,搅拌使孢子充分分散,制成孢子悬浮液,用血球计数板测定孢子浓度,并计算出每平方毫米的产孢量。

菌落增长直径(mm)=菌落直径－菌饼直径(5 mm);

菌落生长速率(mm/d)=菌落增长直径/培养时间(10 d);

产孢量(个/mm^2)=孢子数/(mL)×15/(π×半径^2)

1.2.2　低温下球孢白僵菌 YB8 对韭蛆的毒力测定

将韭菜假茎剪成 1 cm 小段放入 1×10^8 个/mL 的孢子悬浮液中浸泡 5 min 后放入直径 9 cm 的培养皿中,培养皿底层用琼脂和滤纸进行保湿,在滤纸上滴加 600 μL 1×10^8 个/mL 的孢子悬浮液,每皿接入 30 头健康、活泼的韭菜迟眼蕈蚊 3 龄幼虫,每处理重复 5 次,同时设无菌水对照。分别放入 8、11、14、17、20、23 和 25℃,RH =70%±5%,全黑暗恒温箱中饲养,11 d 后记录死亡虫数,计算校正死亡率,并收集活虫。以毛笔尖轻触虫体,幼虫不动或身体明显收缩为死亡,记录死亡虫数并计算校正死亡率。

校正死亡率=(处理组死亡率－对照组死亡率)/(1－对照组死亡率)×100%。

1.2.3　数据处理

利用统计软件 SPSS 17.0 对所得数据进行统计分析。对不同处理间的差异进行单因素方差分析(One-way ANOVA)和 Tukey's-b(K)氏多重比较($P<0.05$)。

2　结果与分析

2.1　低温对球孢白僵菌菌落生长速率和产孢量的影响

以 25℃作为对照温度,研究低温对球孢白僵菌

生长速率和产孢量的影响。表 1 数据结果表明：7 个温度下球孢白僵菌均能生长。25℃时菌落生长速率达到最高，为 3.15 mm/d，10 d 菌落直径扩展了 31.5 mm。球孢白僵菌菌落生长速率随温度的降低而明显降低（$F=206.901$，$df=6$，$P=0.000$）。8℃时菌落生长速率最低，为 0.19 mm/d。球孢白僵菌的产孢量随温度的降低而减少，25℃、23℃时与 20℃时的产孢量分别为 5.94×10^6、5.57×10^6、4.80×10^6 个/mm²，且三者相比差异不显著（$F=11.617$，$df=6$，$P=0.176$），8～17℃产孢量与 25℃相比明显减少（$F=11.617$，$df=6$，$P=0.000$），其中 8℃产孢量最低，为 0.89×10^6 个/mm²。因此在供试温度范围内，25℃相比其他温度最适合球孢白僵菌 YB8 的生长。

表 1 不同温度下白僵菌生长速率和产孢量[1)]

Table 1 Colony growth rate and spore yields at different temperatures

温度/℃ Temperature	菌落生长速率/mm·d⁻¹ Colony growth rate	产孢量/×10⁶ 个·(mm²)⁻¹ Spore yield
8	(0.19±0.02)f	(0.89±0.02)c
11	(0.41±0.03)f	(2.22±0.38)bc
14	(0.94±0.05)e	(2.98±0.66)b
17	(1.41±0.06)d	(2.68±0.25)b
20	(1.94±0.10)c	(4.80±0.57)a
23	(2.91±0.15)b	(5.57±0.81)a
25	(3.15±0.07)a	(5.94±0.55)a

1) 不同的小写字母表示不同温度之间差异显著（$P<0.05$）。下同。The different lowercase letters indicate significant differences among different temperatures ($P<0.05$). The same below.

2.2 低温下球孢白僵菌对韭蛆的毒力

表 2 试验结果表明，接种球孢白僵菌后韭蛆校正死亡率随温度的降低而明显降低。

表 2 不同温度下白僵菌对韭蛆的毒力

Table 2 Virulence of *Beauveria bassiana* against *Bradysia odoriphaga* at different temperatures

温度/℃ Temperature	校正死亡率/% Corrected mortality rate
8	(0.00±0.00)d
11	(0.00±0.00)d
14	(0.00±0.00)d
17	(15.33±0.69)c
20	(24.67±1.70)b
23	(29.33±0.24)b
25	(45.33±1.67)a

25℃时接种后 11 d 韭蛆校正死亡率达到最高，为 45.33%，与其他温度差异显著（$F=214.652$，$df=6$，$P=0.000$），8、11 及 14℃下接种后 11 d 韭蛆校正死亡率为 0，而 20℃和 23℃时韭蛆校正死亡率分别为 24.67%、29.33%，两者之间差异不显著（$F=214.652$，$df=6$，$P=0.678$）。因此在供试温度范围内，25℃相比其他温度球孢白僵菌对韭蛆致病力更强。

3 结论与讨论

关于白僵菌对昆虫的毒力研究较多的有蚜虫、粉虱、菜粉蝶、玉米螟等[18]。已有的研究表明，白僵菌生长发育不同时期（如菌丝生长期和产孢期）的最适温度不尽相同。本试验结果表明，供试温度范围内最适合球孢白僵菌生长发育的温度为 25℃，从最低生长温度开始，随着温度的升高生长速度提高，产孢量增加，这与前人的研究结果基本一致[7,12-13,19]。在一定的温度范围内，白僵菌的侵染力随温度升高而增强[20]，这与本文中 25℃时白僵菌孢子萌发率最高、萌发速度最快及对韭蛆的毒力最强的结果一致。

根据韭蛆的田间发生规律[3]以及白僵菌对低龄韭蛆毒力更高这一特点，田间可在春季和秋季韭蛆低龄幼虫[21]时期使用白僵菌，此时山东地区土壤 5 cm 深度周平均温度为 18.5～22.8℃[22]。由于 20～23℃下球孢白僵菌对韭蛆的致死率较低，可以加大白僵菌的使用量，这样既保证了白僵菌的最优生长条件，又提高了防治效果。虽然低温下白僵菌对当代韭蛆的毒力较低，但白僵菌孢子在韭蛆体内仍能繁殖、累积，并能垂直传播到下一代[23-24]，从而实现持续控制害虫的目标，白僵菌对下一代韭蛆的影响有待进一步研究。

参考文献

[1] 杨集昆，张学敏. 韭菜蛆的鉴定迟眼蕈蚊属二新种（双翅目：眼蕈蚊科）[J]. 北京农业大学学报，1985，11(2)：153－156.

[2] 李文香，杨玉婷，吴青君，等. 韭菜迟眼蕈蚊研究进展[J]. 植物保护，2015，41(5)：8－12.

[3] 冯惠琴，郑方强. 韭蛆发生规律及防治研究[J]. 山东农业大学学报，1987，18(1)：71－80.

[4] 梅增霞，吴青君，张友军，等. 韭菜迟眼蕈蚊的生物学、生态学及其防治[J]. 昆虫知识，2003，40(5)：396－398.

[5] 翟锦彬，黄秀梨，许萍. 杀虫真菌——球孢白僵菌的昆虫致病机理研究近况[J]. 微生物学通报，1995，22(1)：45－48.

[6] 顾丽嫱，李春香，张淑红. 球孢白僵菌和布氏白僵菌对甜菜夜蛾的室内毒力测定[J]. 江苏农业科学，2009(3)：118－120.

[7] 蒲蛰龙，李增智. 昆虫真菌学[M]. 合肥：安徽科学技术出版

社,1996.

[8] ISKANDAROV U S, GUZALOVA A G, DAVRANOV K D. Effects of nutrient medium composition and temperature on the germination of conidia and the entomopathogenic activity of the fungi [J]. Prikladnaia Biokhimiia Mikrobiologiia,2006,42(1):81 - 85.

[9] 林华峰,樊美珍,李增智. 不同温湿度下白僵菌对松毛虫的侵染致病效应[J]. 应用生态学报,1998,9(2):195 - 200.

[10] 原贵生,谢映平,牛宇,等. 白僵菌对山西林区油松毛虫的致病效果[J]. 中国生物防治,2006,22(2):118 - 122.

[11] 武觐文. 微生物杀虫剂的应用[M]//陈昌洁. 松毛虫综合管理. 北京:中国林业出版社,1990:256 - 273.

[12] 邝灼彬,吕利华,冯夏,等. 温度及常见农药对球孢白僵菌生物学特性的影响[J]. 华南农业大学学报,2005,26(3):26 - 29.

[13] 孙鲁娟,吴孔明,郭予元. 不同温、湿度下白僵菌对棉铃虫幼虫的致病力[J]. 昆虫学报,2001,44(4):501 - 506.

[14] 何余容,吕利华,邝灼彬,等. 不同温湿度下球孢白僵菌对小猿叶甲的致病力[J]. 昆虫学报,2005,48(5):679 - 686.

[15] DAL BELLO G, PADIN S, JUAREZ P, et al. Biocontrol of *Acanthoscelides obtectus* and *Sitophilus oryzae* with diatomaceous earth and *Beauveria bassiana* on stored grains[J]. Biocontrol Science and Technology,2006,16(1/2):215 - 220.

[16] VASSILAKOS T N, ATHANASSIOU C G, KAVALLIERATOS N G, et al. Influence of temperature on the insecticidal effect of *Beauveria bassiana* in combination with diatomaceous earth against *Rhyzopertha dominica* and *Sitophilus oryzae* on stored wheat [J]. Biological Control,2006,38(2):270 - 281.

[17] 周仙红,张思聪,庄乾营,等. 韭蛆人工饲料配方筛选及饲养效果比较[J]. 昆虫学报,2015,58(11):1245 - 1252.

[18] 曹卫平,冯书亮,王金耀,等. 白僵菌防治刺吸式口器害虫研究与应用进展[J]. 中国生物防治,2006,22(2):129 - 134.

[19] 李荣森,罗绍彬. 微生物防治害虫[M]. 北京:科学出版社,1983:27 - 45.

[20] 李春香,张淑红. 白僵菌对害虫致病性的研究进展[J]. 唐山师范学院学报,2005,27(5):40 - 43.

[21] 陈浩,王玉涛,高欢欢,等. 韭菜迟眼蕈蚊生物防治研究现状与展望[J]. 山东农业科学,2016,48(3):158 - 161.

[22] 周仙红,翟一凡,沈一凡,等. 不同栽培模式韭菜田韭菜迟眼蕈蚊和葱黄寡毛跳甲的种群动态[J]. 植物保护,2016,42(3):215 - 221.

[23] 林华峰,李增智,胡萃. 不同环境中松毛虫感染白僵菌过程的组织病理变化[J]. 安徽农业大学学报,1998,25(4):330 - 335.

[24] QUESADA M E, YOUSEF M, ESTEVEZ A, et al. *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) wound dressing for the control of *Euzophera pinguis* (Lepidoptera: Pyralidae)[J]. Journal of Economic Entomology,2013,106:1602 - 1607.

(责任编辑:杨明丽)

(上接 139 页)

[23] 寻锋, 刘强. 槐绿虎天牛人工饲养的研究[J]. 天津师范大学学报(自然科学版), 2012, 32(4): 78 - 80.

[24] 曹利军, 杨帆, 唐思莹, 等. 适合三种鳞翅目昆虫的一种人工饲料配方[J]. 应用昆虫学报, 2014, 51(5): 1376 - 1386.

[25] 张克斌, 胡木林. 黄斑星天牛人工饲料研究[J]. 林业科学, 1993, 29(3): 227 - 233.

[26] 张永安, 王玉珠, 曲良建. 松褐天牛人工饲养和传代方法及其幼虫人工饲料: 101228853[P]. 2008 - 07 - 30.

[27] 尹新明, 温发园, 江志伟, 等. 管式天牛昆虫幼虫人工饲料及其饲养方法: 100508778 C[P]. 2009.

[28] 蔡守平,何学友,GURR G M,等. 星天牛幼虫人工饲料的饲养效果及温度对其生长的影响(英文)[J]. 林业科学,2016,52(12):141 - 149.

[29] 张霖. 褐梗天牛生物学特性和引诱剂的初步研究[D]. 北京:北京林业大学,2016.

[30] 唐启义. DPS 数据处理系统:实验设计统计分析及数据挖掘[M]. 北京:科学出版社,2010.

[31] 严文斌. 双条杉天牛研究初报[J]. 安徽农业大学学报,2003,30(1):57 - 60.

[32] 王宏琦. 双条杉天牛无公害防治技术研究[D]. 泰安:山东农业大学,2008.

[33] 王延年. 昆虫人工饲料的发展应用和前途[J]. 昆虫知识,1990,27(5):310 - 312.

[34] 崔为正,王伟东. 家蚕人工饲料防腐剂和抗菌素的筛选研究[J]. 山东农业大学学报(自然科学版),1999(3):219 - 225.

[35] 张树坤,王业成,苏建亚,等. 稻纵卷叶螟人工饲料中防霉剂对曲霉的抑制效果[J]. 南京农业大学学报,2014,37(2):59 - 66.

[36] 高苏岚,许志春,弓献词. 双条杉天牛研究进展[J]. 中国森林病虫,2007,26(3):19 - 22.

[37] ELVIRA S, GORRÍA N, MUÑOZ, D, et al. A simplified low-cost diet for rearing *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) and its effect on *S. exigua* nucleopolyhedrovirus production [J]. Journal of Economic Entomology, 2010, 103(1): 17 - 24.

[38] DUBOIS T, HAJEK A E, SMITH S. Methods for rearing the Asian longhorned beetle (Coleoptera: Cerambycidae) on artificial diet [J]. Annals of the Entomological Society of America, 2002, 95(2): 223 - 230.

(责任编辑:田　喆)