

玫烟色棒束孢耐热菌株的筛选及对麦长管蚜的致病力测定

赵建华^{1#}, 王宏民^{2#}, 张天浩¹, 张仙红^{1*}

(1. 山西农业大学农学院, 太谷 030801; 2. 山西农业大学经济管理学院, 太谷 030801)

摘要 采用 48℃ 恒温水浴热胁迫法对玫烟色棒束孢 7 个菌株进行了耐热性测定。结果表明, 热胁迫 45 min 后, 不同菌株的残存活孢率差异显著, 其中 IF-502、IF-904 和 IF-9606 菌株耐热性较强, 残存活孢率均达 50% 以上; IF-7606 菌株耐热性最差, 残存活孢率仅为 28.70%; IF-14、IF-511 和 IF-609 菌株耐热性居中, 残存活孢率 34.72%~36.00%。对耐热性强的 IF-502、IF-904 和 IF-9606 三个菌株对麦长管蚜若蚜的致病力测定表明, IF-904 菌株在 1×10^7 孢子/mL 时对麦长管蚜的致病力最高, 校正死亡率达 88.20%, 致死中时最短, 为 2.67 d。

关键词 玫烟色棒束孢; 耐热菌株; 麦长管蚜; 致病力测定

中图分类号: S 435.122 **文献标识码:** B **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018047

Screening of thermo-tolerable *Isaria fumosorosea* strains and virulence evaluation to *Sitobion avenae*

ZHAO Jianhua¹, WANG Hongmin², ZHANG Tianhao¹, ZHANG Xianhong¹

(1. College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China;

2. College of Economics and Management, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract Thermotolerance of seven *Isaria fumosorosea* strains were determined by exposing thermal stress at 48℃ for 45 min. The results showed that residue viabilities differed significantly among seven strains tested, three strains including IF-502, IF-904, IF-9606 were high thermotolerance due to their residue viabilities more than 50%, but one strain (IF-7606) was weak in thermotolerance due to its residue viabilities of 28.70%. The residue viabilities of the rest strains fell in a range of 34.72%–36.00% and their thermo-tolerance were thus intermediate. In addition, virulence evaluation of high thermo-tolerant strains including IF-502, IF-904 and IF-9606 showed that the IF-904 strain was the highest virulent strain to *Sitobion avenae* with the corrected mortality of 88.20% and the shortest LT₅₀ was 2.67 days.

Key words *Isaria fumosorosea*; thermo-tolerable strains; *Sitobion avenae*; virulence evaluation

虫生真菌是一类重要的病原微生物, 在害虫的生物防治中发挥着重要作用。分生孢子作为虫生真菌制剂的主要成分, 在剂型加工、贮存运输及田间应用中, 会遇到高温、紫外线等不利的环境条件。高温不仅影响真菌孢子的萌发, 还影响着孢子制剂的贮存稳定性和田间宿存^[1-3], 因此耐热性(thermotolerance)是生防真菌的重要抗逆性指标。据报道, 不同地区或同一地区的不同白僵菌菌株其耐热性存在明显差异^[4]; 当环境温度高于 35℃ 时, 一些球孢白僵

菌的孢子萌发和生长都受到制约^[5]; 持续或瞬间高温都会使生防真菌制剂失活或者是丧失毒力^[6]。夏季田间温度经常达 35℃ 以上, 田间植被一般会经历数小时的持续高温, 这在一定程度上已经远远超过了很多虫生真菌的温度耐受力。

玫烟色棒束孢 *Isaria fumosorosea* Wize 是一种重要的昆虫病原真菌, 对白粉虱、蚜虫、小菜蛾幼虫具有很强的致病性, 是一种很有开发潜力的虫生真菌, 但不适宜的环境条件等因素严重影响了该菌的防

收稿日期: 2018-01-28 修订日期: 2018-03-11

基金项目: 山西省自然科学基金(201801D121253)

* 通信作者 E-mail: zxb6288@sina.com

为并列第一作者

治效果。研究表明,玫烟色棒束孢孢子萌发的适宜温度为 26~32℃,相对湿度 85%以上,如果温度超过 35℃、湿度低于 85%,大量的孢子不能萌发^[7-8],此外环境温度还影响玫烟色棒束孢菌剂的贮藏时间和稳定性^[9]。据报道,菌株的耐热性与其贮藏寿命存在显著正相关关系。通过菌株耐热力的测定,可以间接评估孢子的贮藏稳定性^[10]。因此获得耐热性较强的菌株是提高玫烟色棒束孢田间应用效果和延长货架期的重要途径。为此本研究拟通过热胁迫筛选出玫烟色棒束孢耐热性菌株,并测定耐热菌株对麦长管蚜 *Sitobion avenae* Fabricius 若蚜的毒力,以获得耐热性较强且毒力较高的玫烟色棒束孢生防菌株。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试菌株:玫烟色棒束孢 IF-14、IF-502、IF-511、IF-609、IF-7606、IF-904、IF-9606 菌株由山西农业大学昆虫重点实验室提供;

供试蚜虫:供试麦长管蚜为室内采用‘晋麦 47’麦苗饲养的第 3 代 7 日龄若虫。

1.2 耐高温菌株的筛选

1.2.1 孢子悬浮液的制备

将 4℃下斜面保存的玫烟色棒束孢各菌株在室温下活化 24 h 后接种于 PDA 培养基上,并置于培养箱 26℃培养 7 d,用接菌刀将孢子轻轻刮下,用含 0.1% Tween-80 的无菌水稀释孢子悬浮液,加入葡萄糖使其终浓度为 1%,制成 4×10^6 个/mL 孢子悬浮液。

1.2.2 分生孢子耐热性测定

将各供试菌株孢子悬浮液置于 48℃恒温水浴锅中 45 min,取处理后的各菌株孢子悬浮液 0.1 mL,采用凹玻片悬滴法于 25℃的恒温培养箱中培养,36 h 后在显微镜下观察孢子萌发。每次观察 3~5 个视野并求平均值,将未经处理的孢子设为对照(CK),每菌 3 次重复。以 48℃恒温水浴 45 min 后的残存活孢率作为衡量各菌株耐热性的指标。

1.3 玫烟色棒束孢不同耐热菌株对麦长管蚜的毒力测定

将筛选获得的玫烟色棒束孢耐热菌株 IF-14、IF-502、IF-904、IF-9606,在 PDA 培养基上培养 7 d 后,用接菌刀轻轻刮下孢子,并用含 0.1% Tween-80 的无菌水配制成浓度为 1×10^7 个/mL 的孢子悬

浮液,以含 0.1% Tween-80 无菌水作为对照(CK)。取各菌株孢子悬浮液 1 mL 用波特喷雾塔在 100 kPa 压力下喷于供试麦长管蚜体表,沉降时间为 1 s。待虫体体表药液晾干后置于小麦叶片上(湿棉球包裹小麦被剪断的一端),并将带虫叶片置于培养皿内,封口膜封口后置于恒温 26℃、光照 L//D=12 h//12 h 的培养箱中饲养,每天观察并记录蚜虫的死亡情况,统计麦长管蚜的死亡率,连续观察 5 d。每处理设 3 次重复。

1.4 玫烟色棒束孢 IF-904 菌株对麦长管蚜的毒力测定

将筛选获得的玫烟色棒束孢 IF-904 菌株在 PDA 培养基平板上培养 7 d 后,用接菌刀轻轻刮下孢子,用含 0.1% 的 Tween-80 水溶液配制成浓度为 1×10^8 个/mL 的孢子悬浮液,依次稀释为 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 个/mL,用涡旋振荡器将孢子悬浮液混合均匀用于毒力测定。每处理 20 头试虫,3 次重复,以含 0.1% Tween-80 的无菌水作对照。接菌方法同 1.3。

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%。

2 结果与分析

2.1 玫烟色棒束孢不同菌株分生孢子的耐热性

玫烟色棒束孢不同菌株分生孢子耐热性测定结果如表 1。由表 1 可知,各菌株分生孢子的存活率差异极显著,供试的 IF-14、IF-502、IF-511、IF-609、IF-7606、IF-904、IF-9606 菌株残存活孢率分别为 35.00%、52.31%、36.00%、34.72%、28.70%、51.69%、57.28%,其中 IF-502、IF-904 和 IF-9606 菌株热胁迫后孢子存活率均达 50%以上,表明它们具有较强的耐热性;菌株 IF-14、IF-511 和 IF-609 孢子存活率为 34.72%~36.00%,耐热性居中;而 IF-7606 菌株孢子存活率仅为 28.70%,耐热性较差;而对照组的孢子存活率虽然各菌株间也存在显著差异,但均在 79.32%以上。由此可见,同一菌种不同菌株对高温的耐受性存在较大的差异。

2.2 玫烟色棒束孢不同耐热性菌株对麦长管蚜的毒力

不同耐热性菌株对麦长管蚜的毒力如表 2 所示。由表可知,不同菌株随着作用时间的延长对麦长管蚜的致病力存在差异。处理 1 d 后,麦长管蚜开始出现死亡,但死亡率较低,耐热性居中的菌株

IF-14 和耐热性最强的 IF-9606 菌株对麦长管蚜的致病力差异显著。处理 2 d 后,各供试菌株对麦长管蚜的致病力显著增强,耐热性较强的 IF-904 菌株表现出较好的毒力效果,累积校正死亡率高达 58.33%,与其他菌株的致病力差异显著,耐热性最强的 IF-9606 菌株和耐热性居中的 IF-14 菌株对麦长管蚜的致病力无明显差异,累计校正死亡率均为 33.33%。随着作用时间的延长,不同菌株对麦长管蚜的累积死

亡率逐渐增加,各供试菌株的毒力差异显著,LT₅₀ 的变化范围是 2.67~3.26 d。在接菌 5 d 时,各供试菌株的累积校正死亡率变化范围是 66.67%~88.20%,耐热性较强的 IF-904 菌株累积校正死亡率最高,为 88.20%,与其他菌株对麦长管蚜的致病力差异显著。测定结果显示:作用同样的时间后,耐热性较强的 IF-904 菌株与其他菌株相比,累积死亡率最高且致死中时最短。

表 1 玫烟色棒束孢不同菌株的分生孢子残存活孢率¹⁾
Table 1 Residue viabilities of conidia of *Isaria fumosorosea* strains

组别 Group	残存活孢率/% Residue viabilities of conidia						
	IF-14	IF-502	IF-511	IF-609	IF-7606	IF-904	IF-9606
处理 Treatment	(35.00±0.06)b	(52.31±0.04)b	(36.00±0.02)b	(34.72±0.07)b	(28.70±0.01)b	(51.69±0.01)b	(57.28±0.04)b
对照 CK	(85.20±0.04)a	(92.00±0.04)a	(86.58±0.01)a	(85.51±0.06)a	(79.32±0.03)a	(93.83±0.01)a	(94.24±0.03)a

1) 同列不同小写字母表示显著性差异($P<0.05$)。下同。
Means with different lowercase letters in column differed based on Tukey's test ($P<0.05$) after One-way ANOVA. The same below.

表 2 不同耐热性菌株对麦长管蚜的致病力
Table 2 Virulence of *Isaria fumosorosea* strains with different thermotolerance on *Sitobion avenae*

菌株 Strain	校正死亡率/% Corrected accumulative mortality					LT ₅₀ /d
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	
IF-14	(5.00±0.00)b	(33.33±6.00)b	(48.29±2.99)b	(60.00±1.82)b	(72.56±1.96)b	3.15
IF-502	(6.67±2.04)b	(38.30±1.72)b	(51.30±1.21)b	(61.60±2.74)b	(66.67±3.73)b	3.52
IF-904	(3.33±1.67)b	(58.33±1.67)a	(65.53±1.72)a	(81.82±1.82)a	(88.20±1.96)a	2.67
IF-9606	(11.66±1.67)a	(33.33±1.67)b	(62.08±3.45)a	(65.49±3.63)b	(72.55±1.96)b	3.26

2.3 玫烟色棒束孢 IF-904 对麦长管蚜的致死率

不同浓度的玫烟色棒束孢 IF-904 菌株孢子悬浮液对麦长管蚜的毒力如表 3 所示。随着孢子浓度的升高,麦长管蚜的累计校正死亡率也升高。说明玫烟色棒束孢 IF-904 菌株对麦长管蚜的毒力效果随着孢子浓度的升高而增强。当浓度从 1×10^4 提

高到 1×10^5 个/mL 后,麦长管蚜校正死亡率增长速率变缓;当浓度达到 1×10^7 个/mL 时,校正死亡率达到 88.20%。菌株 IF-904 对麦长管蚜的致死中浓度(LC₅₀)为 4.26×10^5 个/mL,95%置信区间为 $1.93\times10^5\sim9.42\times10^5$ 个/mL。

表 3 IF-904 菌株不同浓度的孢子悬浮液对麦长管蚜的毒力
Table 3 Virulence of *Isaria fumosorosea* IF-904 strain under various concentrations against *Sitobion avenae*

浓度/个·mL ⁻¹ Concentration	校正死亡率/% Corrected mortality	毒力回归方程 LC-P line	LC ₅₀ (95%FL)/个·mL ⁻¹
1×10^4	15.79 c	$y=1.38x+0.64$	$4.26\times10^5(1.93\times10^5\sim9.42\times10^5)$
1×10^5	26.41 c		
1×10^6	68.33 b		
1×10^7	88.20 a		
1×10^8	90.71 a		

3 讨论

环境温度不仅会影响虫生真菌的致病力、侵染速率、真菌病害的流行及杀虫效果^[11-13],而且对真菌杀虫制剂的贮存稳定性也有很大的影响^[14]。目前,真菌杀虫剂面临常温货架期偏短、田间稳定性较差等问题,特别是夏季高温往往会超过生防真菌的适

温上限,在很大程度上影响生防真菌的使用效果。因此,耐热生防真菌对于提高田间适用性和常温贮藏时间具有十分重要的意义。本试验采用 48℃ 恒温水浴 45 min 作为热胁迫条件,对实验室保存的 7 株玫烟色棒束孢进行了耐热性筛选,供试菌株明显分为耐热性强、中、弱三类,较好地揭示了该菌的耐热性变化范围,这对玫烟色棒束孢不同菌株菌剂贮存期

稳定性的评价提供了理论依据。

毒力是衡量生防微生物菌种或菌株应用潜力的重要指标,也是筛选优良生防菌株的基本依据。在相同孢子浓度和相同的温、湿度条件下,筛选获得的耐热性不同的玫烟色棒束孢菌株对麦长管蚜均有一定的致病力,不同耐热性菌株侵染致病效果不同且差异明显。耐热性较强的玫烟色棒束孢 IF-904 菌株在较高浓度(1×10^7 个/mL) 时和较低浓度(1×10^6 个/mL) 时,均表现出一定的致病力,且累积校正死亡率随着孢子浓度的增加而升高。这与黄建华等^[15]研究玫烟色棒束孢对小菜蛾致病力的研究结果相似。表明玫烟色棒束孢 IF-904 菌株是一株很有应用潜力的生防菌株。

参考文献

[1] 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.

[2] TANADA Y, KAYA H K. Insect pathology [M]. New York: Academic Press, 1993: 569.

[3] MCCLATCHIE G V, MOORE D, BATEMAN R P, et al. Effect of temperature on the viability of the conidia of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations [J]. Mycological Research, 1994, 98(7): 749 - 756.

[4] 李娟, 吴圣勇, 王晓青, 等. 防治西花蓟马的球孢白僵菌菌株筛选及耐热性测定[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(6): 845 - 852.

[5] 俞佳, 冯明光. 基于分生孢子热胁迫反应的球孢白僵菌耐热菌株筛选[J]. 菌物学报, 2006, 25(2): 278 - 283.

[6] 蒲蛰龙, 李增智. 昆虫病原真菌学[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1996.

[7] 张仙红, 李文英, 贺运春. 影响虫生真菌玫烟色拟青霉孢子萌发的因素探析[J]. 中国农学通报, 2007, 23(7): 478 - 481.

[8] 田晶, 李雅, 刁红亮, 等. 环境因子对玫烟色棒束孢 IF-1106 菌株孢子萌发的影响[J]. 天津农业科学, 2016, 22(4): 8 - 12.

[9] 张伟, 吕利华, 何余容, 等. 玫烟色棒束孢与短期 35℃ 高温对小菜蛾 3 龄幼虫的联合作用[J]. 环境昆虫学报, 2013, 35(2): 182 - 189.

[10] 王成树, 王四宝, 樊美珍, 等. 球孢白僵菌菌株耐热性与贮藏稳定性的关系[J]. 中国生物防治, 1999, 15(4): 162 - 165.

[11] 冯明光, 应盛华. 不同含水量和温度下贮存中球孢白僵菌分生孢子活力与内贮营养的衰变[J]. 应用生态学报, 2002, 13(4): 439 - 443.

[12] HALLSWORTH J E, MAGAN N. Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus* [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1999, 74: 261 - 266.

[13] INGLIS G D, JOHNSON D L, GOETTEL M S. Effects of temperature and sunlight on mycosis of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Sympodulosporae) of grasshoppers under field conditions [J]. Environmental Entomology, 1997, 26: 400 - 409.

[14] LORD J C. Low humidity, moderate temperature and desiccant dust favor efficacy of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) for the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bruchidae) [J]. Biological Control, 2005, 34: 180 - 186.

[15] 黄建华, 罗任华, 秦文婧, 等. 玫烟色棒束孢对小菜蛾的致病力[J]. 江西农业学报, 2012, 24(10): 62 - 64.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 211 页)

地上部、地下部鲜重防效分别为 39.90%、54.32%、60.24%, 但其处理后胡麻生物产量和籽粒产量均最高, 这主要是由于灭草松对靶标杂草野艾蒿营养生长的强烈抑制作用导致野艾蒿植株低矮, 在与胡麻的生长竞争中处于劣势, 将野艾蒿的危害控制在胡麻受害阈值以下所致。因此, 对各除草剂处理后胡麻的药害、经济性状、生物产量以及籽粒产量并结合除草剂对野艾蒿的防除效果进行综合分析, 胡麻田恶性杂草野艾蒿防除除草剂选择适宜度依次为: 75%二氯吡啶酸 SG+56% 2 甲 4 氯钠盐 SP 混配> 75%二氯吡啶酸 SG>48%灭草松 AS>75%二氯吡啶酸 SG+90%莠去津 WG 混配。

参考文献

[1] 邢福, 杨允非. 松嫩平原野艾蒿无性系种群根茎的年龄结构分

析[J]. 草业学报, 2004, 13(1): 21 - 25.

[2] 李璞, 龚庆维, 李联芳, 等. 草甘膦、百草敌对野艾蒿地下根茎杀伤力的研究[J]. 杂草科学, 1989(4): 9 - 11.

[3] 祁旭升, 王兴荣, 许军, 等. 胡麻种质资源成株期抗旱性评价[J]. 中国农业科学, 2010, 43(15): 3076 - 3087.

[4] 赵利, 党占海, 张建平, 等. 不同类型胡麻品种资源品质特性及其相关性研究[J]. 干旱地区农业研究, 2008, 26(5): 6 - 9.

[5] 王士强, 胡银岗, 余奎军, 等. 小麦抗旱相关农艺性状和生理生化性状的灰色关联度分析[J]. 中国农业科学, 2007, 40(11): 2452 - 2459.

[6] 汤树德, 李汉昌, 石晶波. 化学除草剂对土壤中微生物生态和物质转化过程的影响[J]. 土壤学报 1984, 21(1): 95 - 104.

[7] 刘惠君, 詹秀明, 刘维屏. 四种酰胺类除草剂对土壤酶活性的影响[J]. 中国环境科学, 2005, 25(5): 611 - 614.

[8] 张爱云, 蔡道基. 除草剂对土壤微生物活性、土壤氨化作用和硝化作用的影响[J]. 农村生态环境, 1990(3): 62 - 65.

[9] 吴文君, 高希武. 生物农药及其应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 73 - 153.

(责任编辑: 杨明丽)