

doi:10.16779/j.cnki.1003-5508.2017.04.006

# 莱氏野村菌复合粉炮防治杜仲梦尼夜蛾试验研究

朱天辉<sup>1</sup>, 彭娇洋<sup>1</sup>, 刘倩<sup>1</sup>, 贺敬宣<sup>1</sup>, 马欣欣<sup>1</sup>, 黄祖惠<sup>2</sup>, 吴继云<sup>2</sup>, 张霞<sup>2</sup>

(1. 四川农业大学, 四川 温江 611130; 2. 大邑县农林局, 四川 大邑 611330)

**摘要:** 梦尼夜蛾是危害杜仲的重要食叶害虫, 本文以成都市大邑县杜仲人工种植林为试验基地, 采集罹病的杜仲梦尼夜蛾僵虫, 分离获得10株4种生长良好的纯菌种, 表型特征、显微形态结合分子生物学检测该4种天敌微生物分别为: 桔青霉, 产黄青霉, 球孢白僵菌(次优势菌), 莱氏野村菌(优势菌株)。经室内幼虫毒力比较试验证明莱氏野村菌强于球孢白僵菌, 电子显微镜下可观察到该菌在幼虫表皮下生长, 二者可望作为林间无公害防治杜仲梦尼夜蛾的原型生防菌株。将莱氏野村菌与球孢白僵菌制成复合粉炮在林间施用333.33 hm<sup>2</sup>, 一般在1周后开始产生防治效果(虫口减退率:70%), 随着时间增加, 生防菌不断繁殖, 防效可持续提高, 稳定在85.1%~90%间, 示范区与试验区趋势一致, 粉炮施用后每半月收集的僵虫可分离到莱氏野村菌、球孢白僵菌, 说明两菌能有效在幼虫上定殖。

**关键词:** 杜仲梦尼夜蛾; 白僵菌; 莱氏野村菌; 生物防治

**中图分类号:** S763.7

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1003-5508(2017)04-0025-05

杜仲(学名 *Eucommia ulmoides* Oliver), 为杜仲科植物, 多年生落叶乔木, 为我国特有药用植物, 其应用涵盖医药、保健食品、特种工业、木材加工、环境保护等方面。杜仲具有较高的医疗保健价值和经济价值, 市场前景看好。但近年来一种专门取食杜仲嫩叶的杜仲梦尼夜蛾为害<sup>[1]</sup>, 大大降低了杜仲的质量和产量, 成为影响杜仲发展的又一要素, 曾采用化学药物防治该虫<sup>[2]</sup>, 但易造成环境污染。为科学、生态、绿色防控杜仲梦尼夜蛾危害, 在2015年~2016年发现大邑杜仲林间虫生真菌自然感染梦尼夜蛾基础上, 开展了莱氏野村菌、白僵菌分离纯化、毒力测定研究及复合粉炮用于杜仲梦尼夜蛾的防控试验, 取得了较好成效, 能将其危害控制在经济阈值以内。

## 1 材料与方 法

### 1.1 虫生真菌样品采集

在四川省大邑县斜源镇杜仲种植基地, 将杜仲林区按虫害发生程度划分为重、中、轻、无4个区。从每个林区随机选择3株杜仲在树干及树根周围获取自然感染虫尸(因树冠较高, 取样不便, 且被真菌浸染死亡的虫体无法攀附树叶, 死亡的虫尸大都坠

落地表, 故未从树叶上取样), 虫体僵硬、包被菌丝体, 用培养皿分装标记好带回实验室分离。未能及时分离的样本放入0℃的冰箱保存。

### 1.2 分离方法

(1) 在超净工作台中, 将感染真菌但体表未长霉层的僵虫用蒸馏水冲洗干净后, 75%酒精浸3s~5s, 5% NaClO消毒3min~5min, 灭菌水冲洗3次, 吸水纸吸干表面; 用灭菌刀将虫体切成50mm小块, 置于PDA培养基上, 重复3次, 25℃, 培养5d~7d, 用接种针挑取虫体或培养基上长出的菌丝, 转接到SDAY培养基上, 培养10d后观察菌落生长和产孢情况。

(2) 将体表长有霉层的僵虫放置于培养皿中, 用接种环轻轻挑取虫体表面的孢子粉在PDA上划线接种培养, 重复3次。待长出菌落后挑取菌丝转接到SDAY培养基上, 25℃下培养培养, 观察菌落生长和产孢情况。

### 1.3 虫生真菌分子生物学检测

#### 1.3.1 菌丝收集与DNA提取

将纯化后菌株转接铺有玻璃纸的SDAY培养基表面, 25℃下培养7d~10d, 刮取表面菌丝, 冷冻干燥后备用。称取100mg左右的菌丝, 用液氮迅速研

收稿日期: 2017-03-16

作者简介: 朱天辉(1963-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事林木病虫害及生物防治的研究。

磨成粉末,按照天根植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取基因组 DNA。

### 1.3.2 PCR 扩增

采用真菌通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGT-GAACCTGCGG-3')/ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATT-GATATGC-3'),扩增包含 ITS1-5.8 S-ITS2 全部序列和部分 18 S 以及 28 S rDNA 在内的 ITS 片段,引物由上海生工合成。

25  $\mu\text{L}$  的扩增体系,其中 2.5  $\mu\text{L}$  10  $\times$  PCR buffer, 10  $\mu\text{mol/L}$  的引物 ITS1/ITS4 各 0.8  $\mu\text{L}$ , 2.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 dNTP 2  $\mu\text{L}$ , 25  $\text{mmol/L}$  的  $\text{MgCl}_2$  2  $\mu\text{L}$ , 5  $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  *Taq* DNA 聚合酶 0.2  $\mu\text{L}$ , DNA 提取液 1  $\mu\text{L}$ , 加灭菌双蒸水补足 25  $\mu\text{L}$ 。以  $\text{ddH}_2\text{O}$  代替模板 DNA 设置阴性对照。扩增程序:94  $^\circ\text{C}$  预变性 4 min; 94  $^\circ\text{C}$  变性 40 s, 55  $^\circ\text{C}$  退火 30 s, 72  $^\circ\text{C}$  延伸 40 s, 共 35 个循环;72  $^\circ\text{C}$  延伸 7 min。反应结束后,取 5  $\mu\text{L}$  PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶中电泳检测,100 V 电泳 30 min,在凝胶成像系统上拍照并观察。

### 1.3.3 产物测序与序列比对分析

PCR 产物纯化后交由上海生工进行双向测序,用 DNASTar-SeqMan 软件对测序结果进行拼接整合。将菌株的 ITS 序列与 GenBank 核酸数据库中相关菌株进行同源性比较,从 GenBank 上下载真菌菌属相关的 ITS 序列,并用 MEGA5.0 软件进行同源性分析,用 Clustal W 算法进行聚类分析,ITS 序列相似性大于 95% 小于 99%,鉴定为相同属,小于等于 95%,鉴定为同科,以白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 外群,构建虫生真菌的系统发育树。

### 1.4 虫生真菌的致病力比较

选取健康的各龄期及虫态的杜仲梦尼夜蛾,采用浸蘸法用上述分离纯化获得的真菌分别对其进行感染,观察发病症状,比较分析虫生真菌的致病力。

取感染莱氏野村菌 12 h 以内的虫体,在超净工作台内,先刮取虫体表皮,小心祛除表皮上脂肪和其他杂质,刮至表皮呈半透明状即可,将表皮置于载玻片上,滴 1 滴无菌水,盖上盖玻片,将做好的载玻片放置于电子显微镜下观察,观察菌丝在杜仲梦尼夜蛾表皮的侵染情况。

### 1.5 莱氏野村菌白僵菌复合型粉炮防治试验

将上述莱氏野村菌、白僵菌加工成复合型粉炮后进行野外林间试验。

#### 1.5.1 试验区防效测定

333.33  $\text{hm}^2$  试验区分两部分:对照区和防治区,分别在试验后定期取样调查(以未施菌粉为对照),在对照区、防治区分别设置标准株各 20 株,用

高枝剪剪取枝条,调查活虫数。虫口密度以百叶活虫数表示。每半月收集僵虫于实验室分离致病微生物(莱氏野村菌、球孢白僵菌)。每 666.7  $\text{m}^2$  用粉炮 2 个( $250 \text{ g} \cdot \text{个}^{-1}$ )。

#### 1.5.2 示范区粉炮防治

300  $\text{hm}^2$  示范区施用时间约 10 d ~ 12 d,与试验区设有隔离带,并设有 20 株杜仲定点观察防效。每 666.7  $\text{m}^2$  用粉炮 2 个( $125 \text{ g} \cdot \text{个}^{-1}$ )。示范区防效评价以同期试验区所设对照数据为基础。

#### 1.5.3 粉炮施放时间与管理

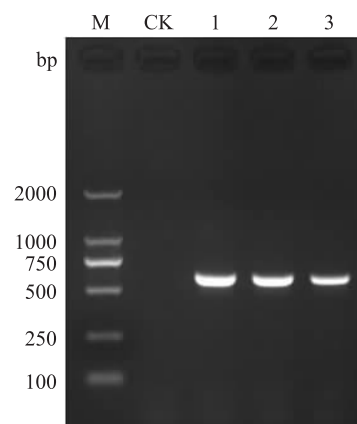
选择清晨或傍晚时间施用以提高防效。粉炮施用后,由专人定点定期观察记录,定期在实验基地观察实验效果,交流试验进展情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 虫生真菌 ITS 序列分析与系统发育

经 3 次分离,获得 10 株 4 种类型分离比例较高、菌落单一生长良好的疑似虫生真菌,通过 ITS 基因序列分析,在 GenBank 数据库中进行同源性比对,结果证明:类型 I 的菌株与桔青霉的同源性为 99%;类型 II 的菌株与产黄青霉的同源性为 99%;类型 III 的菌株与球孢白僵菌的同源性为 99%;类型 IV 的 3 个菌株 m11a, m11b 和 m12 的 ITS 基因长度分别为 623 bp、613 bp、624 bp,通过在 GenBank 数据库中进行同源性比对,发现菌株 m11a, m11b 和 m12 与莱氏野村菌(登录号 AF368501)的同源性均为 99%,表明类型 IV 的 3 菌株均为莱氏野村菌。

根据莱氏野村菌 rDNA-ITS 电泳结果如图 1,构建以白僵菌为外群的莱氏野村菌系统发育树如图 2 所示。



CK: 阴性对照; 1~3: m11a, m11b、m12

图 1 莱氏野村菌 rDNA-ITS 电泳图

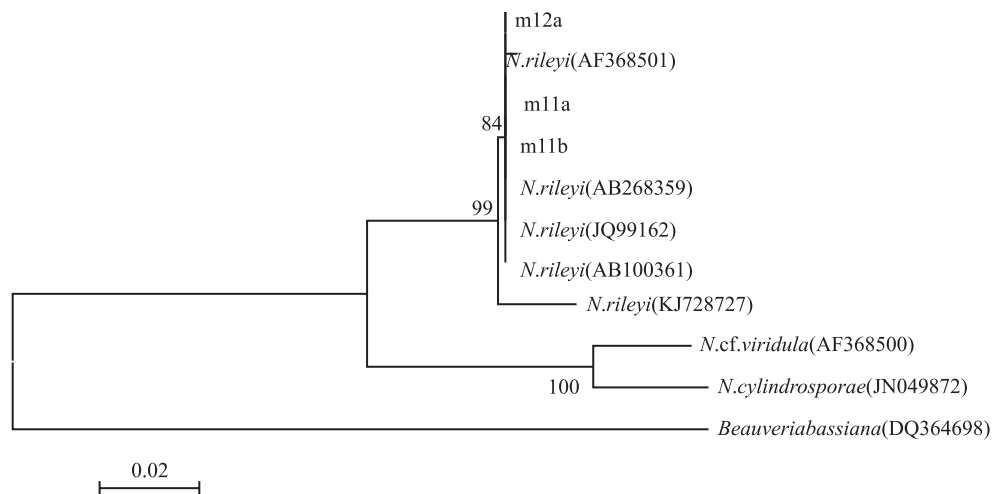


图2 基于莱氏野村菌 rDNA-ITS 序列的系统发育树

## 2.2 虫生真菌致病力

4 种真菌对杜仲梦尼夜蛾的致病力测定表明莱氏野村菌毒力最高,白僵菌次之,产黄青霉、橘青霉无毒力(表 1)。莱氏野村菌初感染时,虫体抵抗力减弱,进食减少,表皮出现局部黑斑;12 h 后,虫体死亡,虫身变僵直,手戳虫身尚有弹性;24 h 后,虫体局部出现白色丝状,手戳无弹性,虫尸彻底僵硬;36 h 后,虫体足渐失水皱缩,每个体节环内均有白色绿色丝状菌丝长出;48 h 后,菌丝布满虫体表面,肉眼可见虫尸周散落围绿色粉状孢子粉;72 h 后,虫体内外均被菌丝侵染,不再皱缩,僵直干硬,肉眼可见绿色粉状孢子粉包裹虫身。

表 1 4 种虫生真菌对幼虫毒力比较

菌种	产黄青霉	橘青霉	白僵菌	莱氏野村菌
毒性	无毒害作用	无毒害作用	致死	致死
半衰期	不明显	不明显	较长	短
致死率	无	无	较高	高

在电子显微镜下观察初侵染 12 h 以内的虫体表皮,可清晰的看到附着于表皮生长的莱氏野村菌菌丝(图 3)。

## 2.3 复合粉炮林间防效显著

试验区设在仰天窝药场的场部周围和喇叭岗。根据梦尼夜蛾在大邑的生物学特性(第 1 代幼虫出现在 5 月上中下旬、第 2 代幼虫出现在 6 月中下旬~7 月上旬、第 3 代幼虫出现在 7 月下旬~8 月上中旬),试验区复合粉炮分别在施用后不同时间(持续 4 个月区间)取样调查(以未施菌粉为对照),在对照区、防治区分别设置标准株各 20 株,用高枝剪剪取枝条,调查活虫数。虫口密度以百叶活虫数表示。

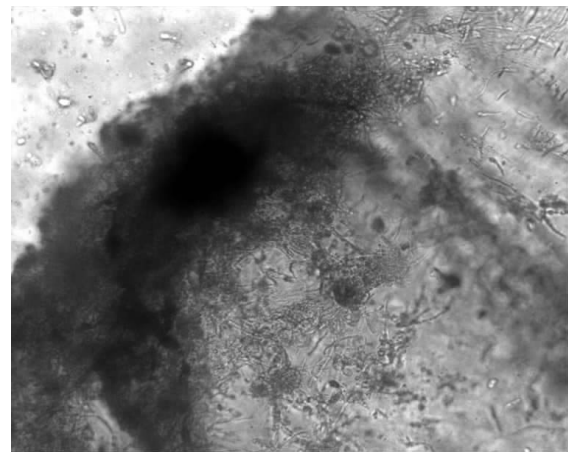


图3 电子显微镜下虫体表皮生长的莱氏野村菌菌丝

相对防效(虫口减退率)% = 1 - 防治区百叶活虫数/对照区百叶活虫数。在 1 周后开始有生防效果(虫口减退率:70%),以后持续增高,维持一个高水平防效 86%~90%(表 2)。每半月收集的僵虫可分离到莱氏野村菌、球孢白僵菌。

大面积(300 hm<sup>2</sup>)示范区防治设在仰天窝场的灰窑岗、火挟沟一带。示范区复合粉炮施用与试验区同步进行。示范区设置标准株 20 株,用高枝剪剪取枝条,调查活虫数,虫口密度以百叶活虫数表示(同上),以试验区的未施菌粉数据为对照。粉炮施用 1 周后虫口减退率为 70%,随着时间增加,生防菌不断繁殖,防效可持续提高,稳定在 85.1%~90%间(表 3)。示范区与试验区趋势一致。

粉炮施用 7 d 后梦尼夜蛾发生明显感染复合感染率较高。

表2 复合粉炮试验区监测与防治效果

监测时间	地点(处理)	面积 (hm <sup>2</sup> )	监测株数 (株)	平均每株杜仲100张叶片虫口数:头		虫口减退率 (%)	说明
				对照 *	防治		
2016-5-24	场部周围:对照区	13.33	20	4.8 *		0	防治前:第1代幼虫期
	喇叭岗:防治区	20.00	20	4.8			
2016-6-1	场部周围:对照区	13.33	20	1.0 *		70.0	
	喇叭岗:防治区	20.00	20	0.3			
2016-6-7	场部周围:对照区	13.33	20	1.1 *		86.3	
	喇叭岗:防治区	20.00	20	0.15			
2016-6-14	场部周围:对照区	13.33	20	4.3 *		86.0	
	喇叭岗:防治区	20.00	20	0.6			
2016-6-26	场部周围:对照区	13.33	20	4.7 *		86.2	
	喇叭岗:防治区	23.00	20	0.65			
2016-7-6	场部周围:对照区	13.33	20	4.5 *		86.7	
	喇叭岗:防治区	20.00	20	0.6			
2016-7-15	场部周围:对照区	13.33	20	1.5 *		86.7	
	喇叭岗:防治区	20.00	20	0.2			
2016-7-20	场部周围:对照区	13.33	20	1.5 *		86.7	
	喇叭岗:防治区	20.00	20	0.2			
2016-7-30	场部周围:对照区	13.33	20	4.3 *		88.4	
	喇叭岗:防治区	20.00	20	0.5			
2016-8-10	场部周围:对照区	13.33	20	4.3 *		89.5	
	喇叭岗:防治区	20.00	20	0.45			
2016-8-20	场部周围:对照区	13.33	20	2.9 *		89.7	
	喇叭岗:防治区	20.00	20	0.3			
2016-8-30	场部周围:对照区	13.33	20	0.5 *		90	
	喇叭岗:防治区	20.00	20	0.05			
2016-9-30	场部周围:对照区	1.33	20	0			越冬状态
	喇叭岗:防治区	20.00	20	0			

表中平均每株杜仲100张叶片虫口数说明: \* 对照区数据:4.8头——(19株每株5头,1株1头);1.0头——(20株每株1头);1.1头——(19株每株1头,1株3头);4.3头——(10株每株5头,9株每株4头,1株0头);4.7头——(15株每株4头,4株每株7头,1株6头);4.5头——(10株每株5头,10株每株4头);1.5头——(10株每株1头,10株每株2头);2.9头——(11株每株2头,9株每株4头);0.5头。(10株每株1头,10株每株0头)

防治区数据:0.3头——6株每株1头,14株0头;0.15——3株每株1头,17株0头;0.6——12株每株1头,8株0头;0.65——13株每株1头,7株0头;0.2——4株每株1头,16株0头;0.5——10株每株1头,10株0头;0.45——9株每株1头,11株0头;0.05——1株为1头,19株为0头。

表3 复合粉炮示范区监测与防治效果

监测时间	地点	面积 (hm <sup>2</sup> )	监测株数 (株)	平均每株杜仲100张叶片虫口数		虫口减退率 (%)	说明:示范区数据
				对照 *	防治		
2016-5-23	灰窑岗	166.67	20	4.8	4.8	0	防治前:第1代幼虫期
	火挟沟	166.67	20	4.8	4.8		
2016-6-1	灰窑岗	166.67	20	1.0	0.3	70	
2016-6-6	火挟沟	133.33	20	1.1	0.3	72.7	
2016-6-7	灰窑岗	166.67	20	1.1	0.3	72.7	
2016-6-12	火挟沟	133.33	20	4.3	0.6	86.0	
2016-6-14	灰窑岗	166.67	20	4.3	0.6	86.0	
2016-6-20	火挟沟	133.33	20	4.7	0.7	85.1	
2016-6-26	灰窑岗	166.67	20	4.7	0.6	87.2	
2016-6-30	火挟沟	133.33	20	4.7	0.6	87.2	
2016-7-6	灰窑岗	166.67	20	4.5	0.5	88.9	
2016-7-15	火挟沟	133.33	20	1.5	0.15	90.0	
2016-7-20	灰窑岗	166.67	20	1.5	0.15	90.0	
2016-7-30	火挟沟	133.33	20	4.3	0.5	88.4	
2016-8-10	灰窑岗	166.67	20	4.3	0.5	88.4	
2016-8-20	火挟沟	133.33	20	2.9	0.3	89.7	
2016-8-30	灰窑岗	166.67	20	0.5	0.05	90.0	
	火挟沟	133.33	20	0.5	0.05		
2016-9-30	灰窑岗	166.67	20	0	0		
	火挟沟	133.33	20	0	0		

表中平均每株杜仲100张叶片虫口数说明: \* 示范区对照以试验区对照数据为基础。

示范区防治数据:0.3——6株每株1头,14株0头;0.6——12株每株1头,8株0头;0.7——14株每株1头,6株0头;0.5——10株每株1头,10株0头;0.15——3株每株1头,17株0头;0.05——1株为1头,19株为0头

### 3 讨论与结论

球孢白僵菌(*B. bassiana*)为常见虫生真菌,是国内外广泛用于害虫生物防治的杀虫真菌之一<sup>[3]</sup>。国内外研究人员利用球孢白僵菌防治玉米螟、松毛虫、小蔗螟、盲椿、谷象、柑桔红蜘蛛和蚜虫等农林害虫。特别是对玉米螟和松毛虫的生物防治,在国内已作为常规手段连年使用。由于球孢白僵菌能有效地控制虫口数量,同时不伤害其他天敌昆虫和有益生物,完全符合有害生物综合治理的宗旨,同时由于其容易大量生产,防治成本较有竞争力,因而被认为是最具开发潜力的一种昆虫病原真菌,其生产工艺相对成熟,其产品可满足生产上需要。

莱氏野村菌(*Nomuraearileyi*)是一种重要的昆虫病原真菌<sup>[4]</sup>,能感染 30 多种鳞翅目昆虫,尤其对夜蛾科害虫的致病力很强,且常能引起病害流行,对人体和其他非目标生物包括昆虫寄生虫和捕食者无毒害作用,因而受到人们的重视。至 1883 年 Farlow 首次报道发现莱氏野村菌以来,很多国家都相继发现了此菌并对其做了大量研究,名称各异,Kish 等对其做了大量系统种属研究后,于 1974 年正式确定其名称为莱氏野村菌,将其他名称作为异名,得到该界的普遍承认和使用。在美国、巴西、阿根廷、澳大利亚等国,莱氏野村菌已经广泛的应用于田间的害虫防治,其中防治对象主要为鳞翅目尤其是夜蛾类害虫,通常采用的方法是以孢子悬浮液的形式喷施到田间植株上或以土壤缓释的方式来感染靶标害虫。Devi<sup>[5]</sup>(1995)做过两组对比,一是将莱氏野村菌的分生孢子配成悬浮液喷施于叶片上,并在夜间灌溉以调节湿度条件;二是直接将分生孢子连同培养基施入靠近植株的土壤中,前 4 d 灌溉调节土壤湿度。结果发现:第 1 组处理前 4 d 的持效性降低为 70%,6 d 起开始快速降低,到第 12 d 菌株的杀虫效率降低到了零。而第 2 组的杀虫效果降低相对较慢,直到施药后的第 14 d,杀虫效果只降低到了 77%,而且土壤里的培养基上仍然能够观察到有孢子的继续形成。这个试验为田间病害提供了一个思

路,可以利用土壤缓释的方法,避开紫外线对真菌孢子的杀伤作用,延长孢子寿命和持效期。

与其它虫生真菌相比,莱氏野村菌在控制害虫种群和对非靶标生物的安全性上具有较为明显的优势,具有较强的开发和应用潜力。我国对此菌的研究较晚,首次发现和分离得到此菌是在 1975 年,此后也做了大量培养及应用试验,但重点大都放在了此菌的分离鉴定和致病性测定等方面,近几年已对其生物学、几丁质酶发酵条件及几丁质酶基因克隆、蛋白质测序等进行过研究报道,还对其进行了附着胞的荧光显微及扫描电镜观察<sup>[6]</sup>,相关发酵条件优化的报道也有所增加,但大都停留在实验室内,而此菌分生孢子粉的生产、在环境中的宿存能力等问题虽然已有学者开始着手研究,但并未见有将此菌成功用于大规模生产相关的报道,成为了影响其大规模开发和应用的制约因素,建议此虫生真菌可立项研究,以解决其规模化生产工艺问题。

本研究中的复合粉炮林间防效显著,一般在 1 周后开始有产生防治效果(虫口减退率:70%),以后持续增高,维持一个高水平防效 85.1%~90%。示范区与试验区趋势一致。并从僵虫上可分离到莱氏野村菌、球孢白僵菌。目前球孢白僵菌粉炮生产已成熟,将莱氏野村菌、球孢白僵菌制成复合制剂成本较高,有关技术尚需进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 高贵珍,曹稳根,刘小阳,等.两种药用植物叶的营养成分和药用价值分析[J].淮北煤师院学报,2003(1):44~46.
- [2] 李建林,吕永财.利用毒环毒绳防治杜仲夜蛾[J].西北林业学报,1994,4.
- [3] 夏如冰.中国生物防治科技的发展及其动因初探[J].中国农史,2000,8.
- [4] 陆永跃,尹楚道.莱氏野村菌对棉铃虫致病力及田间控制作用初步研究[J].植物保护,1998,24(4):14~17.
- [5] Devi P S V. Soil treatment with *Nomuraearileyi*: a promising technique for the control of *Spodopteralitura* on groundnut. *Biocontrol Science and Technology*, 1995, 5(3):361~364.
- [6] 樊美珍,黄勃,王建树,等.几种虫生真菌附着胞的荧光显微及扫描电镜观察[J].菌物系统,1999,18(3):249~253.