

doi:10.16779/j.cnki.1003-5508.2017.04.007

## 4株天牛致病菌对川硬皮肿腿蜂的毒力测定

陶园媛\*, 向茂榕, 刘昊泽, 王理顺, 何勇, 杨伟\*\*, 杨桦, 杨春平  
(四川农业大学林学院森林保护实验室, 四川成都 611130)

**摘要:**利用肿腿蜂携菌防治天牛,可发挥肿腿蜂主动搜索和病菌致病力强的优势,收到较单纯放蜂或喷施菌剂更好的效果。但需保证携带的病菌不会显著影响肿腿蜂的寄主搜索能力。为了利用川硬皮肿腿蜂携带病原菌防治松墨天牛,本文测定了4株松墨天牛致病菌的孢子粉和孢子悬浮剂对川硬皮肿腿蜂的毒力。结果表明:雌成蜂携带粉剂孢子的死亡率高于携带悬浮剂孢子的死亡率;当喷施孢子悬浮剂时,4个菌株的累计死亡率随浓度的增加而增加;白僵菌对川硬皮肿腿蜂的毒力较绿僵菌高,致死速率也较绿僵菌大。研究结果可为川硬皮肿腿蜂携菌防治松墨天牛的菌种选择和剂型研发提供依据。

**关键词:**川硬皮肿腿蜂;松墨天牛;白僵菌;绿僵菌;毒力测定

**中图分类号:**S763.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-5508(2017)04-0030-04

## Virulence Determination of Four *Monochamus alternatus* Pathogens on *Scleroderma sichuanensis*

TAO Yuan-yuan\* XIANG Mao-rong LIU Hao-ze WANG Li-shun HE Yong  
YANG Wei\*\* YANG Hua YANG Chun-ping

(Forest Conservation Laboratory of Forestry College, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China)

**Abstract:** Making use of Bethylidae carrying pathogens to prevent and control the longicorns could play advantage of active search of Bethylidae and strong pathogenicity of pathogens, better than releasing Bethylidae only or spraying microbial inoculum. However, it was necessary to ensure that the carrying pathogens would not significantly affect the Bethylidae' host search ability. In order to use *Scleroderma sichuanensis* carrying pathogens to prevent and control *Monochamus alternatus*, this paper measured the virulence of the conidial powder and spore suspensions of four strains of pathogens on *S. sichuanensis*. The results showed that the mortality rate of the powder spores in *S. sichuanensis* was higher than that of the suspension spores. When spraying spore suspension, the cumulative mortality of four strains increased along with the increasing concentration. For *S. sichuanensis*, the virulence of *Beauveria bassiana* was relatively higher than that of *Metarhizium anisopliae*, and the lethal rate of *B. bassiana* was also higher than that of *M. anisopliae*. Research results could provide some basis data for the selection of strains and development of microbial inoculum which was useful for *S. sichuanensis* carrying pathogens to prevent the *M. alternatus*.

**Key words:** *Scleroderma sichuanensis*, *Monochamus alternatus*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, Virulence determination

收稿日期:2017-01-18

基金项目:四川省大学生创新训练计划项目201410626023。

作者简介:陶园媛,女,四川农业大学林学院森林保护专业2017届本科生。

\*\* 通讯作者:Corresponding author, E-mail: ywei0218@aliyun.com。

松墨天牛是危害我国松树的重要蛀干害虫,分布在我国 20 个省(市),更是松树的毁灭性病害——松材线虫病<sup>[1~2]</sup>的主要媒介昆虫<sup>[3~4]</sup>。目前,国内外控制松材线虫病的关键环节是控制其传播媒介松墨天牛<sup>[5]</sup>。利用天敌昆虫和病原微生物防治松墨天牛是两条主要的生物防治途径。

川硬皮肿腿蜂(*Scleroderma sichuanensis* Xiao)属膜翅目、肿腿蜂科、天牛肿腿蜂属<sup>[6]</sup>,作为一种有效的能够防治林木钻蛀性害虫的优良寄生蜂,对天牛等钻蛀性害虫有重大的生防价值,但该蜂防治的寄主虫龄有一定局限<sup>[7~9]</sup>;白僵菌等病原菌对天牛有较强的毒力,但病原菌难进入蛀道感染天牛。因此单独利用上述一种方法很难将松墨天牛的种群压低至经济容许水平以下。而以生物导弹为理念,利用川硬皮肿腿蜂携带致病菌防治松墨天牛可能是一条新的有效途径<sup>[10]</sup>。

要利用川硬皮肿腿蜂携带致病菌防治松墨天牛,必需保证携带的病菌不会对川硬皮肿腿蜂有很强的毒力,不会显著降低其寄主搜寻能力。本实验通过测定四株天牛致病菌的孢子粉和孢子悬浮剂对川硬皮肿腿蜂的毒力大小,分析不同的菌株与不同的剂型对川硬皮肿腿蜂的毒力,为利用川硬皮肿腿蜂携菌防治松墨天牛奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 供试菌株

菌株	来源
绿僵菌 1 号	四川农业大学森保实验室提供的感染松墨天牛幼虫的绿僵菌
白僵菌 1 号	四川农业大学森保实验室提供的感染松墨天牛幼虫的白僵菌
绿僵菌 2 号	西北农林科技大学提供的分离自松墨天牛幼虫的绿僵菌
白僵菌 2 号	西北农林科技大学提供的分离自松墨天牛幼虫的白僵菌

#### 1.1.2 供试虫源

四川农业大学森保实验室提供的川硬皮肿腿蜂雌成虫(以下简称川蜂)。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 孢子悬浮液的制备

将四个菌株接种在 PDA 培养基上,放入人工气候箱中培养,待各菌株充分产孢后,分别用无菌水将

孢子洗入 100 ml 0.1% 的吐温-80 无菌水溶液中,在磁力搅拌器上充分搅拌,待均匀分散后,获孢子悬浮液。在 400 倍显微镜下用血球计数板计量孢子数,据孢子悬浮液的初始浓度确定稀释倍数,配成  $1 \times 10^6$  cfu · ml<sup>-1</sup>、 $1 \times 10^7$  cfu · ml<sup>-1</sup>、 $1 \times 10^8$  cfu · ml<sup>-1</sup> 的菌液,放在 4℃ 冰箱内备用。

#### 1.2.2 孢子悬浮液对川硬皮肿腿蜂的毒力测定

每个菌株为一处理,选择大小一致活泼的川蜂先放于喷有灭菌水的滤纸上爬走,去掉自身携带的杂物。将配好的不同浓度菌液分别装入小型喷雾器中,手持喷雾器分别将各浓度的孢子悬浮液喷施在川蜂体上,每个浓度设 7 个重复,每个重复 20 只。然后将处理后的川蜂分别放入对应的组培瓶中,并投入消毒后的黄粉虫蛹,置于 25℃ ± 1℃、RH 70% ~ 80% 人工气候箱中。以喷施含 0.1% 吐温-80 无菌水的川蜂为对照组,在相同条件下培养。每天观察记录试虫的死亡数,计算平均死亡率。

#### 1.2.3 孢子粉对川硬皮肿腿蜂的毒力测定

每个菌株为一处理,选择大小一致活泼的川蜂先放于喷有灭菌水的滤纸上爬走,去掉自身携带的杂物。采用平板爬行法,将川蜂轻置于产好孢子的平皿上,任其自由爬行,携带孢子粉,将处理后的川蜂放于装有消毒了的黄粉虫蛹的组培瓶中,每瓶 20 只,置于 25℃ ± 1℃、RH 70% ~ 80% 人工气候箱中培养,每处理设 7 个重复,不设置对照。每天观察记录试虫的死亡数,计算平均死亡率。

#### 1.2.4 数据处理

以上试验获得的数据计算平均死亡率,本试验的对照组死亡率在 5% ~ 20% 之间,需要用对照死亡率对试验死亡率结果进行校正,得到校正死亡率。实验数据由 DPS 软件进行生物测定分析<sup>[11]</sup>,计算出致死中剂量(LD50)。

$$\text{死亡率}(\%) = \text{实验组死亡数} / \text{供试虫数} \times 100$$

$$\text{校正死亡率}(\%) = (\text{实验组死亡率} - \text{对照组死亡率}) / (1 - \text{对照组死亡率}) \times 100$$

## 2 结果与分析

### 2.1 孢子悬浮液对川硬皮肿腿蜂的毒力

用孢子悬浮液处理川蜂的生测结果见表 1。由表 1 可知,白僵菌 2 对川蜂的毒力最高,LD50 为 7.213 8 cfu · ml<sup>-1</sup>,然后依次是白僵菌 1、绿僵菌 1,LD50 分别为 8.594 1 cfu · ml<sup>-1</sup>、12.829 0 cfu ·

ml<sup>-1</sup>。绿僵菌2对川蜂毒力最小,LD50为13.4015 cfu·ml<sup>-1</sup>。从4个菌株的毒力回归方程的斜率看:斜率大小为白僵菌2 > 白僵菌1 > 绿僵菌2 > 绿僵

菌1,白僵菌2的斜率最大,其致死的速度也最快,而绿僵菌1的斜率最小,表明其致死速度相对较慢。

表1 4个菌株孢子悬浮液对川蜂的毒力测定结果

药剂名称	毒力回归方程	相关系数 r	SE	LD50 对数 (cfu·ml <sup>-1</sup> )	LD95 对数 (cfu·ml <sup>-1</sup> )
绿僵菌1号	Y=0.1168X+3.5021	0.6218	0.0632	12.8290	26.9164
绿僵菌2号	Y=0.1288X+3.2741	0.6979	0.0716	13.4015	26.1737
白僵菌1号	Y=0.1579X+3.6430	0.8675	0.0579	8.5941	19.0113
白僵菌2号	Y=0.1632X+3.8226	0.8792	0.0537	7.2138	17.2921

注:上列数据中的相关性 p > 0.05,并且相关系数 r 存在显著性的差异

喷施各个菌株不同浓度孢子悬浮液的川蜂在人工气候箱中饲养7d后的死亡情况见表2。四个菌株在浓度为10<sup>8</sup> cfu·ml<sup>-1</sup>时,校正死亡率最高,而在浓度为10<sup>6</sup> cfu·ml<sup>-1</sup>时,校正死亡率最低。

表2 4个菌株孢子悬浮液处理7d后的校正死亡率

供试药剂	浓度	供试虫数	死亡虫数	死亡率 (%)	校正死亡率 (%)
绿僵菌1号	10 <sup>6</sup>	20	1.875	9.38	-0.689
	10 <sup>7</sup>	20	3.375	16.88	7.644
	10 <sup>8</sup>	20	9	45	38.89
	0	20	1.8	10	
绿僵菌2号	10 <sup>6</sup>	20	1.714286	8.57	2.041
	10 <sup>7</sup>	20	2.571429	12.86	6.633
	10 <sup>8</sup>	20	7.571429	37.86	33.418
	0	20	1.333333	6.67	
白僵菌1号	10 <sup>6</sup>	20	4.428571	22.14	11.859
	10 <sup>7</sup>	20	7.333333	36.67	28.302
	10 <sup>8</sup>	20	12	60	54.717
	0	20	2.333333	11.67	
白僵菌2号	10 <sup>6</sup>	20	7	35	23.529
	10 <sup>7</sup>	20	7.571429	37.86	26.891
	10 <sup>8</sup>	20	14.28571	71.43	66.386
	0	20	3	15	

从4个菌株不同浓度孢子悬浮液处理后川蜂不同时间累计死亡率的变化中可以看出(图1):当浓度为10<sup>6</sup> cfu·ml<sup>-1</sup>时,白僵菌2随着时间的增加,累计死亡率的增长速率最快,其次是白僵菌1,而绿僵菌1与绿僵菌2的累计死亡率的变化速率趋势相差不大,到第7天时累计死亡率趋于相同;当浓度为10<sup>7</sup> cfu·ml<sup>-1</sup>时,在前3d,4个菌株的累计死亡率的大小相差不大。但从第3天开始,白僵菌2的累计死亡率随着时间的增加,速率变快了,而从第4天开始,白僵菌1的累计死亡率也逐渐变快,在第7天时与白僵菌2的累计死亡率趋于相同。其中绿僵菌1和绿僵菌2在第3、4天时的累计死亡率增长趋势比白僵菌1快,之后增长速率较之变小,绿僵菌1的累计死亡率的增长趋势最小;当浓度为1×10<sup>8</sup> cfu·ml<sup>-1</sup>时,在前2d,白僵菌1的累计死亡率增长速率较其它3个菌株快,而其它3个菌株的累计死亡率

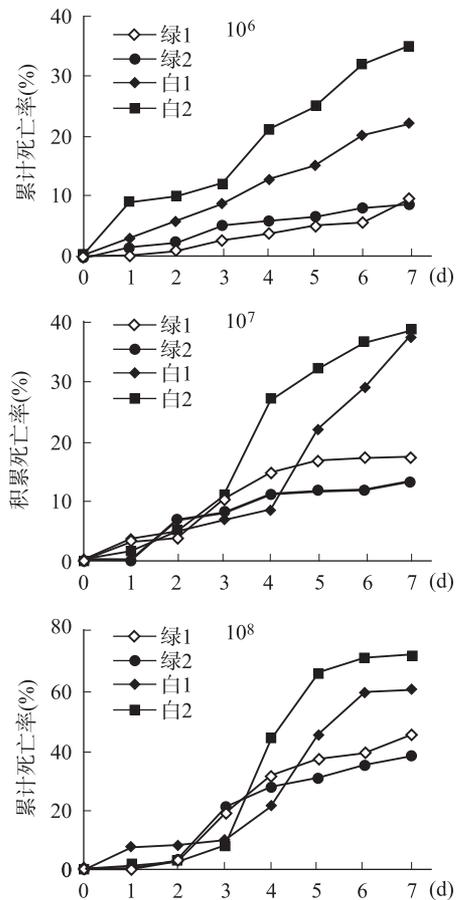


图1 不同浓度孢子悬浮液处理川蜂的累计死亡率

趋近于零。第3天开始白僵菌1与白僵菌2的累计死亡率增长速率迅速增加。综合表1、表2和图1可知,绿僵菌1和绿僵菌2的毒力相对较低。

2.2 孢子粉对川硬皮肿腿蜂的毒力

四个菌株孢子粉处理川蜂7d后的死亡情况表明:白僵菌1处理后死亡的川蜂最多,其次是绿僵菌1,绿僵菌2和白僵菌2的死亡数最少并且死亡数一致。而LT50从大到小分别为:绿僵菌1 > 白僵菌2 > 绿僵菌2 > 白僵菌1,可知致死速度最快的是白僵菌1,绿僵菌1致死速度最慢(表3)。

表 34 个菌株孢子粉处理川蜂 7d 后的死亡情况

供试药剂	供试虫数	死亡虫数	死亡率(%)	LT50(d)
绿僵菌 1 号	20	9.25	46.25	5.77
绿僵菌 2 号	20	8.14	40.71	5.11
白僵菌 1 号	20	19.43	97.14	4.84
白僵菌 2 号	20	8.14	40.71	5.35

从图 2 可知:绿僵菌 2 和白僵菌 2 的累计死亡率曲线相同,前 3 d 绿僵菌 2 和白僵菌 2 的累计死亡率大于其他菌株,第 3 天后白僵菌 1 的累计死亡率大于其他 3 个菌株,并且死亡率的增长趋势明显增大,而其余 3 个菌株累计死亡率接近,增长缓慢。

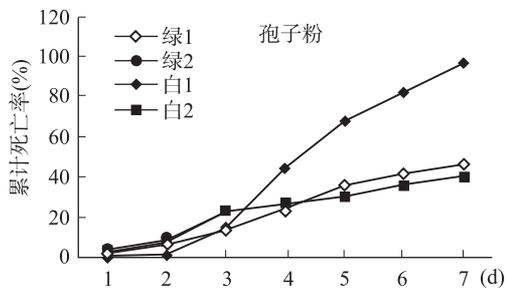


图 2 孢子粉处理川蜂的累计死亡率

综合表 2、表 3、图 1 和图 2,发现孢子粉处理川蜂的死亡率要高于孢子悬浮液,并且致死的速度也相对较快。

### 3 结论与讨论

试验表明:喷施孢子悬浮剂,4 个菌株的累计死亡率都随浓度的增加而增加,毒力较低的两个菌株分别是 LD50 为  $12.8290 \text{ cfu} \cdot \text{ml}^{-1}$  的绿僵菌 1 号和 LD50 为  $13.4015 \text{ cfu} \cdot \text{ml}^{-1}$  的绿僵菌 2 号。而爬行法携带孢子粉时,川蜂携带各个菌株孢子粉的量都相近,都远远高于携带悬浮剂孢子的量,虫体的死亡率都比较高,致死速度快。最高的是白僵菌 1 号,死亡率为 97.14%,LT50 为 4.84/d,其他三个菌株的毒力相差不大。

白僵菌对川蜂的毒力较绿僵菌的高,川蜂被白僵菌致死的速率也相对绿僵菌要大一些。白僵菌中

白 1 的毒力相对较高,绿僵菌中绿 1 的毒力相对较高。这两个菌株均直接分离自感病的天牛虫体,且观察平板可知,白僵菌菌落孢子的黏结程度比绿僵菌孢子的黏结程度高,绿僵菌孢子易散落。这说明不同菌株对川硬皮肿腿蜂的毒力可能与菌株的来源和黏度有关,直接来源于感病天牛虫体的菌株毒力相对较高,黏度越高对川蜂的影响也越大。

利用川硬皮肿腿蜂携带致病菌防治松墨天牛,首先要考虑致病菌对川蜂的毒力。只有天牛致病菌对川蜂的伤害较小,不会显著降低其主动搜寻能力时,利用川蜂携带致病菌防治松墨天牛才有可能。进一步对菌株和剂型开展研究,添加适宜的助剂,降低致病菌对川蜂的毒力,可为川蜂携带致病菌防治松墨天牛奠定良好基础,有利于提高松墨天牛生物防治的实施效果。

### 参考文献:

- [1] Mota M M, Vieira P. Pine wilt disease: a world wide threat to forest ecosystems[M]. New York: Springer, 2008.
- [2] Zhao B G, Futai K, Sutherland J R, et al. Pine wilt disease[M]. 2008.
- [3] 展茂魁,杨忠岐,王小艺等. 松褐天牛成虫松材线虫病的传播能力[J]. 林业科学, 2014, 50(7): 74 ~ 81.
- [4] 陈顺立,林庆源,黄金聪. 南方主要树种害虫综合管理[M]. 厦门:厦门大学出版社, 2004, 442.
- [5] 刘洪剑,束庆龙. 松材线虫病的传播媒介松墨天牛生物防治研究进展[J]. 安徽农学通报, 2007, 13(8): 127 ~ 128.
- [6] 萧刚柔. 天牛的两新寄生天敌 - 川硬皮肿腿蜂及海南硬皮肿腿蜂(膜翅目,肿腿蜂科)[J]. 林业科学研究, 1995(8): 1 ~ 5.
- [7] 罗淋淋,蔡紫玲,林同. 松墨天牛的天敌生防利用研究进展[J]. 中国植保导刊, 2015, (2): 21 ~ 25.
- [8] 杨德敏,曾垂惠,周祖基等. 川硬皮肿腿蜂中间寄主的人工繁育技术研究[J]. 森林病虫害通讯, 1998, (2): 12 ~ 13.
- [9] 张龙渊,张旭晓. 我国松墨天牛生物防治研究进展[J]. 陕西林业科技, 2011, (3): 33 ~ 36.
- [10] 赵正萍,嵇保中,刘曙雯. 利用昆虫携带病原体实施生物防治的研究进展[J]. 南京林业大学学报, 2015, 39(2): 155 ~ 162.
- [11] 唐启义,冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统[M]. 北京:科学出版社, 2002, 647.