

马鞍山林场松墨天牛病原微生物种类 调查鉴定及毒力测定研究

韩兵¹, 朴春根², 汪来发^{2*}, 李永², 申相澈³, 郑荣镇³

(1 安徽省马鞍山市马鞍山林场, 安徽 马鞍山 243031; 2 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 国家林业局森林保护学重点实验室, 北京 100091; 3 韩国国立山林科学院, 韩国 首尔 130-712)

摘要: 在马鞍山市马鞍山林场, 对松材线虫病 (*Bursaphelenchus xylophilus*) 的传媒昆虫松墨天牛 (*Monochamus alternatus*) 的病原微生物进行调查, 结果鉴定了 8 种真菌和 1 种细菌。对松墨天牛幼虫的致病率测定显示不同的微生物种类和同一种白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 的不同菌株均有显著差异。白僵菌的高毒力菌株营养生长无明显差异, 而产孢量有明显差异。通过测定, 白僵菌菌株 226 可能是优良菌株, 对生物防治松墨天牛方面有潜在的实用价值。

关键词: 球孢白僵菌; 松墨天牛; 生物防治

中图分类号: S763 文献标识码: A

Survey Identification and Virulence Test of Pathogens of the Pine Sawyer Beetle *Monochamus alternatus*, at Forest Farm of Maanshan, Anhui Province

HAN Bing¹, PIAO Chun-gen², WANG Lai-fa², LI Yong², SHN Xiang-che³, ZHENG Rong-zhen³

(1. Forest Farm of Maanshan, Maanshan City Maanshan 243031, Anhui, China; 2. Research Institute of Forest Ecology Environment and Protection, CAF, Key Laboratory of Forest Protection State Forestry Administration, Beijing 100091, China; 3. Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea)

Abstract A survey of pathogens of *Monochamus alternatus*, a vector of *Bursaphelenchus xylophilus* was conducted at Forest Farm of Maanshan, Anhui Province. Eight entomogenous fungi and one bacterium were identified from *Monochamus alternatus* in pine forests. Of these species, *Beauveria bassiana* was the most common species. There was substantial variability in virulence among the strains of the same species *B. bassiana* and the different species. The strains of *B. bassiana* were tested on virulence to *M. alternatus*, colony growth and sporogenous ability. These results suggested strain 226 might be an effective agent for controlling of *M. alternatus*.

Key words *Beauveria bassiana*; *Monochamus alternatus*; biological control

由松材线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus* (Stern et Buhner) Nickle) 引起的松材线虫病是我国松林最严重的森林病害, 目前尚无经济有效的防

治方法。松墨天牛 (*Monochamus alternatus* Hope) 是松材线虫病的媒介昆虫, 分布在我国 20 省、市, 因此控制松墨天牛对于防治松材线虫病有着

收稿日期: 2006-12-28

基金项目: 国家科技部社会公益研究专项 (2005DIB3J139) 及中韩林业科研合作课题联合资助

作者简介: 韩兵 (1967—), 男, 安徽无为, 工程师, 从事松材线虫病的管理和研究; 朴春根 (1963—), 男, 吉林汪清人, 博士, 副研究员, 从事林业微生物资源工作。韩兵和朴春根均为第一作者。

* 通讯作者: 汪来发, 男, 安徽望江人, 博士, 研究员, 从事森林病理学和植物线虫学研究。E-mail: nwm@forestry.ac.cn

重要的意义。目前降低松墨天牛种群密度的方法是综合措施的应用,如清理病死木、化学防治和生物防治。与此同时,在自然界一些传染病引起不同时期的松墨天牛死亡,这也是松墨天牛种群密度变化的重要因子。对松材线虫病的传媒昆虫松墨天牛进行生物防治,有效地降低种群密度是控制松材线虫病的途径之一^[1,2]。在自然界,经常观察到松墨天牛特别是幼龄阶段的天牛被微生物感染致死的现象^[3]。在我国,对松墨天牛的病原微生物有过一些调查^[4,5],但主要是作面上的调查,对重点地区尚未作系统深入的调查研究。安徽省马鞍山林场的松林早在 1988 年就发现了松材线虫病^[6],但目前该林场的松材线虫病仍没有得到有效控制。为了更好地挖掘本地的松墨天牛天敌微生物资源,并有目的地进行应用,分别于 2001 年 3—6 月和 2006 年 5—10 月马鞍山林场感染松材线虫病的林分中对松墨天牛病原微生物进行了调查鉴定,并对部分菌株对松墨天牛幼虫的致病率进行了测定,现将结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 样本来源

2001 年 3—6 月和 2006 年 5—10 月从马鞍山林场松材线虫病区不同松林内选取松材线虫病病死松木做样本,解剖检查松墨天牛幼虫,利用诱捕器诱捕松墨天牛成虫,统计和收集体躯僵硬,体表覆盖菌丝的幼虫、成虫。对采集的松墨天牛活幼虫分别保存在一灭菌的指形管中,用脱脂棉团封口。在 25℃ 培养,直到有些虫体体表长出菌丝,以供分离用。

1.2 病原菌分离

真菌培养基为马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、细菌培养基为含 1% 酵母浸膏肉汁冻培养基,经分离、纯化培养,鉴定每分离菌株。所有菌株均经过培养、纯化,保存在冰箱内。

1.3 病原菌鉴定

分离的病原微生物根据真菌形态和细菌形态和生理生化反应而鉴定^[7-10]。

1.4 供试松墨天牛幼虫

由江苏省林业科学研究院研究人员在江苏省江宁宁区东善桥林场采集松墨天牛幼虫,以越冬 4 龄幼虫为供试材料,室内饲养 2 d 剔除带机械损伤和行

为不正常个体,选择健康、大小基本一致的幼虫用于生物测定试验。

1.5 不同种类微生物对松墨天牛幼虫的致病率测定

收集部分菌株孢子稀释至 1.0×10^7 个 \cdot mL⁻¹ 浓度的孢子悬浮液,以无菌水作对照。用微量注射器无伤喷洒 50 μ L 的孢子悬浮液接种在每头松墨天牛体表上,每头松墨天牛经溶液处理后,放在 12 mm \times 75 mm 的指形管中,一试管一头虫,管内装有松木屑,用浸无菌水的脱脂棉封口,分别置于 25℃ 环境条件下饲养,每处理 20 头幼虫;同时以等量无菌水代替孢子悬浮液作为对照。逐天观察记录松墨天牛颜色变化、死活和感染情况。

1.6 部分白僵菌菌株营养生长量测定

在 PDA 培养基上培养好各白僵菌菌株菌落。把直径 10 mm 球孢白僵菌块用接种针放在置于 PDA 平板的中央,使平板的中央沾满孢子,每一菌株 10 个培养皿,即 10 个重复,最后置于 25℃ 下培养,以后每天定时定点用游标卡尺量出各菌株的纵横直径,并作统计分析,比较各菌株营养生长的速率。

1.7 部分白僵菌菌株产孢量测定

部分白僵菌菌株在 PDA 平板上,25℃ 下培养 2 周。用打孔器在菌落中央到边缘的中点处,取出一定面积的菌落,置于 0.1% 吐温-80 的定量无菌水中,充分振荡 2 min,使孢子分散,用血球计数板测定孢子数量,最后换算成每平方毫米的孢子产量。

2 结 果

2.1 松墨天牛幼虫病原微生物的鉴定

经调查和室内分离培养,在自然状况下,马鞍山林场松材线虫病疫区松墨天牛感染病原微生物的种类有 9 种,其中有 8 种真菌和 1 种细菌,其形态和生物学特性如下:

Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin 球孢白僵菌

在 PDA 平板上 25℃ 下培养 7 d 后,菌落生长缓慢,直径 0.8~1.2 cm,菌落初期白色绒毛状,后期淡黄色粉末状。产孢细胞浓密簇生在膨大的柄细胞上,近球形至烧瓶形,颈部延长形成粗 1 μ m,长达 25 μ m 的产孢轴,轴上具小齿突,反复向顶部合轴式产孢。分生孢子无色透明,光滑,绝大多数为球形,直

径 2~3 μm 。周性恒等^[5]发现该菌侵染松墨天牛幼虫, 本项研究得以证实。

B. brongiartii (Sacc) Petch 布氏白僵菌

在 PDA 平板上 25 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 7 d 后, 直径达到 0.8~0.9 cm, 菌落绒毛状至粉状, 白色, 后变为淡黄色。产孢细胞单生, 产孢轴纤细, 长 25 μm , 宽 1.0~1.5 μm , 膝状弯曲, 具小齿突。分生孢子无色透明, 光滑, 椭圆形, 2.5~4.5 \times 2.0~2.5 μm 。这个种与周性恒等^[5]报道的寄生在松墨天牛的是同种。

Fusarium moniliforme Sheklon 串珠镰刀菌

在 PDA 平板上 25 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 7 d 后, 菌落直径达到 6.0~6.5 cm。气生菌丝体由稀疏逐渐变得丰富, 白色絮状菌落, 渐变为橘红色。分生孢子梗无分枝或分枝成单个的管形状。小分生孢子丰富, 头状或链状着生, 无隔膜, 卵形, 7.1~11.5 \times 1.5~2.5 μm 。大分生孢子通常都很丰富, 3~5 个隔膜, 微小的镰刀形状, 24.3~50.0 \times 2.7~3.8 μm 。无厚垣孢子。

F. oxysporum Schlect emend Snyd & Hans 尖孢镰刀菌

在 PDA 平板上 25 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 7 d 后, 菌落生长快, 直径达到 7.0~7.5 cm。气生菌丝由少逐渐增多, 先为白色, 后逐渐变为紫色或蓝色。产孢细胞瓶梗状, 不分枝或分枝。小分生孢子丰富, 聚生成头状, 卵形、椭圆形和圆柱形, 无隔, 5.4~12.0 \times 2.3~3.5 μm 。大分生孢子丰富, 镰刀形状, 3~5 个隔, 27.0~45.0 \times 3.0~4.5 μm 。厚垣孢子单生或串生。

F. solani (Mart) Sacc 茄镰刀菌

在 PDA 平板上 25 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 7 d 后, 直径达到 5.5~6.0 cm, 菌落牛角灰至紫灰。产孢细胞瓶梗状, 不分枝或分枝。小分生孢子丰富, 链状, 无隔, 卵形到圆柱形, 5.4~12.0 \times 2.3~3.5 μm 。大分生孢子丰富、坚实、稠密, 直或微弯, 2~5 隔, 大部分 3 隔, 28.0~42.0 \times 4.0~4.9 μm 。厚垣孢子单生或串生。这与樊美珍等^[11]报道的从美国白蛾 [*Hyphantria cunea* (Drury)] 分离的种一致。

Paecilomyces farinosus (Holm ex Gray) Brown & Smith 粉拟青霉

在 PDA 平板上 25 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 7 d 后, 菌落生长速度中等, 直径为 1.9~2.8 cm, 白色或略带浅黄色, 产生黄色的孢梗束。瓶梗直立在气生菌丝上, 也可轮

生在 100~300 μm 的孢子梗上。瓶梗基部柱状或瓶状。分生孢子卵圆形或纺锤形, 2.0~3.0 \times 1.0~1.8 μm 。陈祝安和陈庆涛^[12]报道该种真菌能侵染柑橘植物 (*Citrus* spp) 害虫黑刺粉虱 (*Aleurocanthus spiniferus* Quaintances)。

Metarrhizium anisopliae (Metsch) Sorokin 金龟子绿僵菌

在 PDA 平板上 25 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 7 d 后, 菌落直径达到 2.0 cm, 菌落绒毛状至棉絮状, 初为白色, 后为橄榄绿。菌丝具分隔和分枝。瓶梗末端形成的分生孢子成长链状排列, 分生孢子大小为 4.5~7.5 \times 2.5~3.1 μm , 略小于以前报道的寄生在松墨天牛幼虫上的绿僵菌分生孢子^[5]。

Verticillium lecanii (Zimmernann) Viegas 蜡蚧轮枝菌

在 PDA 平板上 25 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 14 d 后, 菌落直径达到 2.5~2.8 cm, 白色至淡黄色, 很少有簇生菌丝, 背面为无色或黄色。分生孢子梗不发达, 似营养菌丝, 其上有单生、对生或 3~4 个轮生的瓶梗, 瓶梗纤细, 15.0~39.0 \times 0.8~2.5 μm 。分生孢子在瓶梗顶部聚成头状, 孢子椭圆形至圆柱形, 2.3~10.0 \times 1.0~2.6 μm 。无厚垣孢子。这与陈祝安和陈庆涛^[12]报道的以柑橘植物 (*Citrus* spp) 害虫柑橘木虱 (*Diapherina citri* Kuwayama) 为寄主的蜡蚧轮枝菌一致。

Serratia marcescens Bizio 粘质沙雷氏菌

细胞杆状, 0.5~1.0 \times 0.4~0.5 μm , 周生鞭毛。革兰氏阴性, 产生粉红色色素。在 LB 琼脂培养基上, 该菌株菌落开始时出现半透明黏稠液滴, 菌落光滑, 湿润, 表面呈金属光泽, 边缘整齐或不整齐。生理生化特征是对 V. P 卵磷脂酶、过氧化氢、精氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶反应为阳性, 氧化酶、脲酶反应为阴性, 不利用丙二酸盐; 水解淀粉能力差, 但水解蛋白能力强; 七叶灵呈强阳性反应; 在加入蔗糖、山梨糖醇、侧金盏花醇的培养基中产酸, 在加入树胶醛糖、鼠李糖、纤维二糖、阿拉伯糖的培养基中不产酸; DNA 酶 2 甲苯胺琼脂反应为正反应; 能够形成菌膜。这与冯书亮等^[13]报道的以染黄胫小车蝗 (*Oedaleus infernalis* Saussure) 为寄主的细菌一致。

2.2 松墨天牛幼虫病原微生物的种类及频率

从表 1 中可以看出: 在自然状况下白僵菌在马鞍山林场区出现频率最高, 共分离到 43 次, 占出现

频率的 30.50%, 其次是尖孢镰刀菌也是常见的种, 而经常被认为对昆虫有弱致病力的细菌粘质沙雷氏菌也常分离得到。

表 1 松墨天牛病原微生物的种类及频率

种类	数量 / 次	频度 / %
球孢白僵菌 <i>Beauveria bassiana</i>	43	30.50
布氏白僵菌 <i>B. brongniartii</i> (Sacc.) Petch	5	3.55
串珠镰刀菌 <i>Fusarium moniliforme</i>	5	3.55
尖孢镰刀菌 <i>F. oxysporum</i>	26	18.43
茄镰刀菌 <i>F. solani</i>	4	2.84
镰刀菌多种 <i>F. spp.</i>	13	9.22
粉拟青霉 <i>Paecilomyces farinosus</i>	2	1.42
金龟子绿僵菌 <i>Metarrhizium anisopliae</i>	1	0.71
蜡蚧轮枝菌 <i>Verticillium leanii</i>	3	2.12
其它真菌	16	11.35
粘质沙雷氏菌 <i>Serratia marcescens</i>	12	8.51
其它细菌	11	7.80
(总计)	141	100

2.3 部分种类对松墨天牛幼虫感染死亡率的测定

以 1.0×10^7 个 \cdot mL⁻¹ 浓度的 50 μ L 孢子悬浮液浓度接种, 天牛幼虫第 2 天即可产生反应, 行动也变得很迟缓, 第 14 天时部分种类对松墨天牛幼虫感染死亡率测定结果见表 2。从表中可以看出, 不同真菌种类对松墨天牛的幼虫感染死亡率是不同的, 真菌感染死亡率的顺序是: 球孢白僵菌 = 金龟子绿僵菌 > 布氏白僵菌 > 粉拟青霉 > 尖孢镰刀菌。细菌粘质沙雷氏菌对松墨天牛的幼虫的感染死亡率也达到 65%。

表 2 部分种类对松墨天牛幼虫的校正死亡率

种类	菌株号	校正死亡率 / %
球孢白僵菌	226	100
布氏白僵菌	98	80
尖孢镰刀菌	121	40
金龟子绿僵菌	158	100
蜡蚧轮枝菌	163	75
粉拟青霉	187	65
粘质沙雷氏菌	145	65

2.4 球孢白僵菌不同菌株对松墨天牛幼虫感染死亡率的测定

表 3 球孢白僵菌部分菌株感染松墨天牛幼虫的校正死亡率

菌株号	校正死亡率 / %
226	100
29	100
205	100
151	100
240	100
13	75
4	50
2	90

由于球孢白僵菌在马鞍山林场区出现频率最高, 试验选择部分白僵菌的菌株进行研究, 测定了它们对松墨天牛幼虫的感染死亡率, 结果表明 (见表 3), 不同的球孢白僵菌菌株对松墨天牛幼虫的感染死亡率不同, 选择的 8 个菌株其中有 5 个菌株对松墨天牛幼虫的致病率达到 100%。

2.5 高毒力菌株的营养生长

选择高致病率的球孢白僵菌菌株进行了营养生长的测定 (表 4)。其菌落直径超过 30 mm, 方差分析表明菌株间无显著性差异。

表 4 球孢白僵菌部分菌株的营养生长

菌株号	直径: mm		
	4 d	8 d	14 d
226	10	15	34
29	10	15	34
205	10	15	34
151	9	14	32
240	9	14	32

2.6 高毒力菌株的产孢量

方差分析表明各菌株产孢量之间存在极显著性差异 (表 5), 菌株 226 产孢量明显优于其他各菌株, 接近菌株 240 的 3 倍。

表 5 球孢白僵菌部分菌株 14 d 的产孢量

菌株号	平均产孢量 / (10^6 个 \cdot mm ⁻²)
226	34.27
29	26.85
205	27.61
151	28.3
240	11.34

3 讨论

松墨天牛幼虫在自然界中天敌微生物种类较多, 其中以白僵菌为主, 经过测定球孢白僵菌是对松墨天牛毒力较强的天敌微生物真菌。在安徽和江苏两省的许多地方调查均发现松墨天牛幼虫感染白僵菌的情况。在马鞍山林场于 2001 年 3—6 月的调查很少发现松墨天牛成虫被感染白僵菌的情况, 而在 2006 年 5—10 月, 由于该场近两年在林中实施无纺布防治松墨天牛, 出现松墨天牛成虫感染白僵菌的频率有所增加, 因此在进行真菌频率计算时仅根据 2001 年的调查结果。

从 5 个致病率最高的白僵菌菌株中发现菌株 226 的产孢量最大, 而营养生长和其他菌株没有差异。菌株的产孢量多少是衡量一个优良菌株非常重

要指标,管氏肿腿蜂携带该菌株所产生的孢子在松林中防治松墨天牛取得了一定的效果^[14],今后加强对该菌株其它生物学特性的研究,为松墨天牛的生物防治打下基础。

参考文献:

- [1] 片桐一正, 岛津光明. 松墨天牛的天敌微生物 [J]. 森林防疫, 1980, 29(2): 9~14
- [2] Shinazu M. Potential of the cerambycid parasitic type of *Beauveria brongniartii* for microbial control of *Monochamus alternatus* Hope [J]. Appl Entomol Zool. 1994, 29: 127~130
- [3] Wang L F, Xu F Y, Zhang P, et al. Pathogens of the pine sawyer *Monochamus alternatus* in China [J]. Nematology Monographs & Perspectives 2003, 1: 283~289
- [4] 丁珊, 孙继美, 肖华, 等. 筛选球孢白僵菌菌株的试验 [J]. 森林病虫害通讯, 1997(3): 13~16
- [5] 周性恒, 朱洪兵, 肖文忠. 南京地区松墨天牛病原真菌的调查研究 [A]. 见: 杨宝君. 中国松材线虫病的流行与治理 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1995: 188~191
- [6] 蒋丽雅. 安徽省松材线虫调查及其种类鉴定 [J]. 安徽林业科技, 1988(1): 18~21
- [7] Buchanan R E, Gibbons N E. Manual of Determinative Bacteriology [M]. Eighth edition. Baltimore Waverly Press USA. 1974: 326
- [8] Domsh K H, Gams W. Compendium of Soil Fungi [M]. London: Academic Press. 1980: 34~84
- [9] Nelson P E, Toussoun T A, Marasas W F O. *Fusarium* species An Illustrated Manual for Identification [M]. Pennsylvania: Pennsylvania State University Press. 1983: 128~150
- [10] 蒲蛰龙, 李增智. 昆虫真菌学 [M]. 合肥: 安徽省科技出版社, 1996: 271~361
- [11] 樊美珍, 郭超, 王满生, 等. 西北地区昆虫病原镰刀菌的初步研究 [J]. 陕西林业科技, 1988(4): 33~37
- [12] 陈祝安, 陈庆涛. 柑橘害虫病原真菌的考察和生测 [J]. 微生物学报, 1985, 12(4): 194~197
- [13] 冯书亮, 曹伟平, 范秀华, 等. 一株粘质沙雷氏菌菌株的鉴定及对黄胫小车蝗的毒力测定 [J]. 中国生物防治, 2002, 18(4): 158~161
- [14] Liu H J, Piao C G, Wang L F, et al. Biocontrol of *Monochamus alternatus* Hope by *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill and *Sclerotinia guani* Xiao et Wu [A]. In Korea Forest Research Institute International Symposium of Current Status on Research & Management of Pine Wilt Disease [C]. Seoul Korea. 2006: 19~30