

文章编号:1001-1498(2014)01-0066-05

不同绿僵菌菌株对筛胸梳爪叩甲幼虫的毒力测定

张亚波¹, 叶碧欢¹, 刘振勇², 张 炜³, 舒金平^{1*}

(1. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400; 2. 浙江省德清县森林病虫害防治检疫站, 浙江 德清 313299; 3. 陕西省铜川市森林病虫害防治检疫站, 陕西 铜川 727007)

摘要: 竹林金针虫是南方竹林笋期最为重要的害虫之一, 筛胸梳爪叩甲幼虫是竹林金针虫的优势种群, 应用绿僵菌防治具有重要意义。测定了3株绿僵菌对筛胸梳爪叩甲幼虫的毒力, 并比较了毒土法和毒饵法两种施菌方式对绿僵菌致病力的影响。结果表明, 平沙绿僵菌 WPO8 菌株和金龟子绿僵菌 30104 菌株对筛胸梳爪叩甲幼虫具有明显的致病效果, 在30 d的试验期内, 校正累计死亡率分别为90.0%和66.3%, 半数致死时间(LT_{50})分别为15.8 d和25.8 d; 毒土法的校正累计死亡率略高于毒饵法, 分别为60.1%和52.0%, LT_{50} 分别为22.6 d和28.0 d。金龟子绿僵菌 LRC112 菌株对金针虫无致病力。

关键词: 绿僵菌; 金针虫; 毒力测定; 生物防治

中图分类号: S763

文献标识码: A

Virulence Bioassay of Different *Metarhizium* Strains Against *Melanotus cribricollis* Larvae

ZHANG Ya-bo¹, YE Bi-huan¹, LIU Zhen-yong², ZHANG Wei³, SHU Jin-ping¹

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China;

2. Forest Pest Management and Quarantine Station of Deqing County, Zhejiang Province, Deqing 313299, Zhejiang, China;

3. Forest Pest Management and Quarantine Station of Tongchuan City, Shaanxi Province, Tongchuan 727007, Shaanxi, China)

Abstract: The bamboo wireworm *Melanotus cribricollis* is a devastating pest of underground bamboo shoots in southern China. To explore an alternative control strategy with fungal biocontrol agents, the authors bioassayed the virulence of three *Metarhizium* strains against *Melanotus cribricollis* larvae (120 – 150 mg per capita) in small cups filled with 50 g soil containing 5×10^6 conidia per gram of soil. The application of the strains *Metarhizium pingshaense* WPO8 and *Metarhizium anisopliae* 30104 resulted in the corrected mortalities of 90.0% and 66.3% during a 30 – day period under controlled conditions, respectively, whereas *Metarhizium anisopliae* LRC112 showed no lethal effect on the larvae. Time-mortality analysis led to the median lethal time (LT_{50}) estimates of 15.8 and 25.8 days for the two virulent strains. The high-virulence strain *Metarhizium pingshaense* WPO8 was further assayed for its lethal effect on the larvae in contact of conidia mixed with corn bait and soil respectively. As a result, the soil mixture caused higher mortality (60.1%) and shorter LT_{50} (22.6 days) than the bait mixture (52.0%; 28.0 days).

Key words: *Metarhizium*; *Melanotus cribricollis*; virulence test; biological control

金针虫是叩甲(鞘翅目 Coleoptera, 叩甲科 Elateridae)幼虫的通称, 是一类极为重要的地下害虫, 在

世界各国广为分布。金针虫食性杂, 危害范围包括农作物、林木、果树、中药材及牧草等。在我国, 金针

收稿日期: 2013-02-22

基金项目: “十二五”国家科技计划农村领域项目(2012BAD19B0803); 浙江省科技计划项目(2010C32036)

作者简介: 张亚波(1978—), 女, 吉林长春人, 助理研究员, 博士, 主要从事害虫生物防治研究。

* 通讯作者: shu_jinping001@163.com

虫从南到北分布很广,在北方地区对小麦(*Triticum aestivum* L.)、玉米(*Zea mays* L.)、人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.)等经济作物危害严重;在南方地区,是竹林笋期最为重要的害虫之一。筛胸梳爪叩甲(*Melanotus cribricollis* Faldermann)以幼虫(俗称金针虫、铁丝虫)在土下栖息危害,是竹林金针虫中的优势种群之一,近年来,由于竹林经营方式的改变及呋喃丹等高毒高残留药剂的禁用,致使金针虫在我国南方竹林内爆发成灾^[1],造成重大的经济损失。国内外就金针虫的防治技术开展了大量研究,主要以化学农药防治为主^[2-4]。化学防治会导致竹笋等森林食品及环境污染。因此,安全、高效、环境友好的竹林金针虫防治方法的研究尤为重要。

绿僵菌(*Metarhizium* spp.)是一种广谱昆虫寄生菌,国内外学者已对其开展过大量研究,已广泛用于多种农林害虫的防治^[5-7]。但绿僵菌对金针虫的致病力及防治等研究,国外报道较少^[8-10],国内仅有本实验室报道了一株平沙绿僵菌(*M. pingshanense* Q. T. Chen & H. L. Guo)对竹林金针虫具有较高毒力^[11]。由于不同菌株对同一寄主毒力不同^[12-13],本文应用金龟子绿僵菌(*M. anisopliae* (Metsch.) Sorokin)和平沙绿僵菌共 3 个菌株对竹林内筛胸梳爪叩甲幼虫进行了毒力测定,同时探讨了施菌方式对致病力的影响,以期从中筛选出高致病力的菌株,为林间施用绿僵菌防治金针虫提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 金龟子绿僵菌 30104 菌株,由中国农业科学院植保所提供。平沙绿僵菌 WP08 菌株,由中国林科院亚热带林业研究所森林健康与保护研究室分离,已提交中国科学院微生物菌种保藏中心专利保存(编号 CGMCC No. 4226)。金龟子绿僵菌 LRC112 菌株,由加拿大农业部太平洋食品研究中心提供。

1.1.2 供试昆虫 2008 年 3—4 月从浙江德清上柏镇笋市场收集筛胸梳爪叩甲幼虫,饲养于中国林科院亚热带林业研究所养虫室内(温度 $20 \pm 2^\circ\text{C}$,相对湿度 60%,24 h 黑暗),按照体型大小分在不同的整理箱(20 cm × 30 cm × 30 cm)中饲养,5 月之前饲以新鲜竹笋,5 月之后用小麦、玉米饲养,定期浇水,保持土壤湿润(土壤湿度 $10 \pm 2\%$)。参照 Kabuluk

等的方法^[10,14-15],挑选体质量为 0.12 ~ 0.15 g 的金针虫,将其放入盛有湿润灭菌土的 2 L 大烧杯中,置于 10°C 的培养箱(QHX-250BS-III,上海新苗医疗器械制造有限公司)中黑暗条件下存放 72 h。在测定前 24 h 移至 25°C 培养箱,筛选出健康的幼虫用以生物测定。

1.2 试验方法

1.2.1 孢子悬浮液配制 将各绿僵菌菌株置于 PP-DA 培养基上培养 15 d,用无菌塑料药匙将真菌的分生孢子粉刮到一个干净无菌的盛有 10 mL 0.05% 吐温-80 溶液的三角瓶中,充分振荡,然后加入无菌水,用血球计数板法计算孢子悬浮液原始浓度,之后根据各个试验要求加相应量的纯净水获得供试孢子悬浮液。

1.2.2 供试带菌土配置 土壤取自浙江富阳中国林科院亚热带林业研究所后山毛竹林地($30^\circ 03' 33''$ N, $117^\circ 57' 12''$ E),用 40 目的网筛过筛, 121°C 湿热灭菌 30 min, 150°C 干热灭菌 1 h。土壤带菌浓度用孢子数 · g^{-1} 干土来衡量。在每个一次性纸杯中放 50 g 灭菌土,根据试验需要加入一定量菌悬液,搅拌均匀。

1.2.3 3 株绿僵菌毒力测定 每个菌株设置 30 头试虫,随机分为 3 组,将试虫分别放在装有 50 g 带菌浓度为 5×10^6 个孢子 · g^{-1} 干土的纸杯中,每纸杯 1 头试虫。温度为 25°C ,相对湿度 75%,全黑暗环境,带菌土湿度为 15% ~ 18%,每天通过称量纸杯质量差来补充水分。对照为 0.05% 吐温-80 溶液湿润的灭菌土。死亡的试虫用灭菌水清洗,后置于湿润的灭菌土中,从体表长出物判断死因。试验时间为 30 d,每 3 d 调查试虫死亡数。

1.2.4 不同施菌方式菌株毒力测定 用花盆($\phi_{\text{上}} = 35$ cm, $\phi_{\text{下}} = 30$ cm, $H = 30$ cm)作容器,内盛砂土,高为 20 cm。采用两种施菌方式。(1)毒饵法:WP08 菌株孢子粉拌玉米种子,带菌量为 10^8 个孢子 · g^{-1} 玉米种子,每个花盆中集中放 30 g 带菌玉米种子,玉米种子位置为距表土 2 cm;(2)毒土法:WP08 菌株孢子粉拌灭菌砂土,使得土壤带菌量为 10^6 个孢子 · g^{-1} 砂土,每个花盆灭菌砂土上均匀撒上 5 kg 毒土,厚度约为 5 cm。对照为灭菌砂土。每组处理设 3 个重复,每个重复 30 头试虫。不对养虫室温度进行控制。30 d 之后统计各个处理的死亡率。

1.3 数据处理

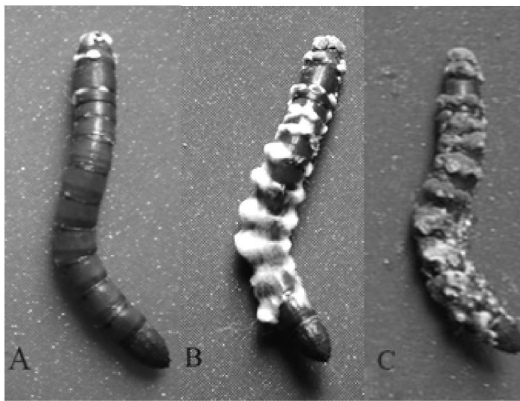
实验数据采用 OriginPro7.5 软件进行分析。半

数致死时间 LT_{50} 计算方法采用机率值分析法^[6]。

2 结果与分析

2.1 绿僵菌对筛胸梳爪叩甲幼虫的感病症状

供试的3株绿僵菌中,30104菌株和WP08菌株对筛胸梳爪叩甲幼虫具有致病作用,其致病症状为:感病致死初期试虫虫体僵硬,体色不变,但失去光泽;在保湿条件下,24 h后从头部以及头部以下几段体节长出白色或淡黄色菌丝(图1-A),48 h后从全身节间膜长出菌丝(图1-B),72 h后墨绿色分生孢子覆盖试虫全身(图1-C)。



A:死亡后24 h;B:死亡后48 h;C:死亡后72 h

图1 绿僵菌在僵虫体表的生长状况

2.2 绿僵菌对筛胸梳爪叩甲幼虫的致死率

3株绿僵菌对筛胸梳爪叩甲幼虫表现出不同程度的致病效果,其中累计校正死亡率较高的是从僵

死金针虫分离出来的平沙绿僵菌 WP08 菌株,30 d 试验期内的累计校正死亡率为 90%;金龟子绿僵菌 30104 菌株的累计校正死亡率为 66.3%;金龟子绿僵菌 LRC112 菌株效果最差,没有任何一条试虫死亡;对照组均健康成活(图2)。

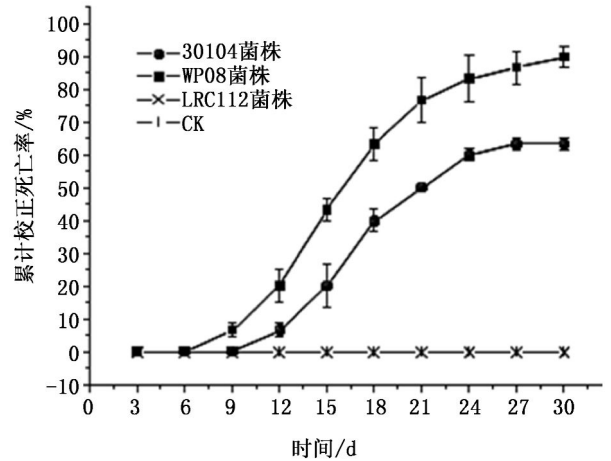


图2 3株绿僵菌对筛胸梳爪叩甲幼虫的毒力测定

2.3 绿僵菌对筛胸梳爪叩甲幼虫的致死速度

供试的3株绿僵菌对筛胸梳爪叩甲幼虫的致死速度也不同,WP08菌株开始致死时间较早,致死速度较快(图2), LT_{50} 为15.8 d;30104菌株的开始致死时间相对较长,致死速度也较慢, LT_{50} 为25.8 d,显著低于WP08菌株,两个菌株致死的试虫僵虫率为100%;LRC112菌株对筛胸梳爪叩甲幼虫则无致病力(表1)。

表1 不同绿僵菌菌株对筛胸梳爪叩甲幼虫的致病效果

菌株	累计死亡率/%	累计校正死亡率/%	回归方程	相关系数 R^2	LT_{50}/d
30104	66.3	66.3 ± 1.92a	$Y = 6.5426X - 3.3507$	0.9626	25.8
WP08	90.0	90.0 ± 3.33b	$Y = 5.4258X - 3.6152$	0.9338	15.8
LRC112	0.0	0.0c	-	-	-
CK	0.0	0.0c	-	-	-

注:同列数据后不同小写字母表示在0.05水平差异显著。下同。

2.4 不同施菌方式菌株的毒力测定

以平沙绿僵菌 WP08 菌株为供试菌株,采用毒饵法和毒土法均可以导致试虫死亡。施菌30 d后,毒土法的校正累计死亡率高于毒饵法,为60.1%,

LT_{50} 为22.6 d;毒饵法累计校正死亡率为52.0%, LT_{50} 为28.0 d;对照组累计校正死亡率为16.6%;毒土法致死速度及致死率均高于毒饵法,但两者差异不显著(表2)。

表2 不同施菌方式菌株对筛胸梳爪叩甲幼虫的致病效果

处理	累计死亡率/%	累计校正死亡率/%	回归方程	相关系数 R^2	LT_{50}/d
毒饵法	60.0	52.0 ± 5.31a	$Y = 6.3905X - 4.1912$	0.9942	28.0
毒土法	66.7	60.1 ± 3.33a	$Y = 4.5772X - 1.0612$	0.9532	22.6
CK	16.6	16.6 ± 2.52b	-	-	-

3 结论与讨论

绿僵菌是一种广谱的昆虫寄生菌,已对 150 多种昆虫进行了小规模的田间防治试验,从防治规模看,已发展成为仅次于白僵菌的真菌杀虫剂^[16]。绿僵菌能在自然土壤环境下长期存活,可有效地控制地下害虫危害和爆发,对地下害虫具有明显优势。金针虫是一类重要的地下害虫,生活史长,不同种类在各地 2~5 a 发生 1 代,大部分时间以幼虫生活在土壤中。绿僵菌可能成为绿色、高效控制金针虫的突破口,国内仅有本实验室报道了一株分离自竹林金针虫的绿僵菌,虽然对该虫具有较高毒力,但在自然界可能存在毒力更高的菌株,筛选高毒力菌株是利用绿僵菌控制金针虫的重中之重。

本试验中供试的 3 株绿僵菌分别从不同种的寄主上分离得到,金龟子绿僵菌 30104 菌株是中国农科院植保所从暗黑鳃金龟(*Holotrichia parallela* Motschulsky)幼虫(蛴螬)上分离得到,金龟子绿僵菌 LRC112 菌株是加拿大从暗色叩甲(*Agriotes obscurus* L.)幼虫(金针虫)上分离得到,平沙绿僵菌 WP08 菌株是本实验室在 2008 年从早园竹(*Phyllostachys praecox* C. D. Chu et C. S. Chao)林内筛胸梳爪叩甲幼虫(金针虫)上分离到的^[11],不同菌株对筛胸梳爪叩甲幼虫的毒力试验结果表明,WP08 菌株致病效果最好,30104 菌株次之,LRC112 菌株对筛胸梳爪叩甲幼虫无致病力。

绿僵菌不同菌株对同一种寄主往往表现出差异极大的寄生率。Ansari 等研究表明,供试的 8 个绿僵菌菌株对暗色叩甲幼虫的寄生率低者只有 10%,高者可达 100%^[17]。本试验中,来自于加拿大的金龟子绿僵菌 LRC112 菌株并没有导致试虫死亡,与之前 Kabaluk、Ansari 等发表的针对暗色叩甲幼虫的研究结果存在明显差异^[14-15,17],Kabaluk 通信中说明,LRC112 菌株对加拿大本地多种金针虫也无致病效果,仅仅对欧洲种的金针虫表现出高毒力。本试验中平沙绿僵菌 WP08 菌株对筛胸梳爪叩甲幼虫的毒力相对较高,说明从原寄主分离出的绿僵菌对该寄主的毒力往往要大于其它寄主来源的绿僵菌。

施菌方式决定着绿僵菌在林间的杀虫效果,从成本、操作和杀虫速度方面比较,毒土法好于毒饵法。WP08 菌株在两种施菌方式下试虫均有死亡,毒土法与毒饵法相比增加了绿僵菌与金针虫的接触机会,所以毒土法对金针虫的死亡率略高于毒饵法。

但两种方法试虫死亡率明显低于实验室 25℃ 的结果,表明温度是影响菌株毒力的重要因素。WP08 菌株在 25~30℃ 下生长良好,在 20℃ 以下菌丝生长和产孢显著下降^[18],而本试验期间,花盆中砂土最低温度 12℃,最高温度 24℃,平均温度为 18±2℃,所以试虫死亡率较实验室 25℃ 时低。另外,筛胸梳爪叩甲幼虫在南方竹林内 4~5a 发生 1 代,2~3 月越冬幼虫开始活动,4 月中下旬为幼虫活动盛期,6~8 月温度升高后幼虫进入越夏期,潜入土壤深层,活动量减少,9 月气温下降,幼虫又开始活动,11 月进入越冬期^[19],由此可以看出,该幼虫活动频繁时期的温度较低不利于绿僵菌的毒力发挥,这也是利用生防菌防治竹林内筛胸梳爪叩甲幼虫的瓶颈,而本试验中 WP08 菌株即使在平均土温低于 20℃ 的条件下,依然有 50% 以上的试虫死亡,也说明该菌株在防治土壤害虫上具有很大应用潜力。

由于野外环境的多变性与复杂性,室内毒力试验往往不能反映出林间应用的真实效果。有报道表明大田试验绿僵菌对金针虫的控制效果要远远低于室内试验的效果,说明绿僵菌的致病力受到复杂的外界条件极大的制约^[14]。本试验中试验条件和环境因素均与林间有较大差异,林间土壤温度、湿度、pH 值、有机质等对绿僵菌毒力的影响,以及绿僵菌在林间应用的施用时间、浓度、剂型及菌药联用等的效果,还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] 徐天森,王浩杰. 中国竹子主要害虫[M]. 北京: 中国林业出版社, 2004:26-27, 45-50
- [2] Chalfant R B, Jansson R K, Seal D R, et al. Ecology and management of sweet potato insects[J]. Annual Review of Entomology, 1990, 35(1):157-180
- [3] Parker W E, Howard J J. The biology and management of wireworms (*Agriotes* spp.) on potato with particular reference to U. K. [J]. Agricultural and Forest Entomology, 2001, 3(2):85-98
- [4] Shamiyeh N B, Pereira R, Straw R A, et al. Control of wireworms in potato[J]. Arthropod Management Ests, 1999, 24:164-165
- [5] Roberts D W, St Leger R J. *Metarhizium* spp., osmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects[J]. Advances in Applied Microbiology, 2004, 54:1-70
- [6] 詹儒林,覃伟权,宋妍,等. 海南椰心叶甲病原菌金龟子绿僵菌的分离、鉴定及其生防潜力[J]. 生态学报, 2007, 27(4):1558-1562
- [7] 何学友,蔡守平,余培旺,等. 金龟子绿僵菌 MaY1TR.04 菌株对松墨天牛成虫的致病力[J]. 昆虫学报, 2008, 51(1):102-107
- [8] Fox J S, Jaques R P. Note on the green-muscardin fungus,

- Metarrhizium anisopliae* (Metch.) Sor., as a control for wireworms [J]. The Canadian Entomologist, 1958, 15(5): 314-315
- [9] Filipchuk O D, Yaroshenko V A, Ismailov V Y, et al. Effectiveness of biological and chemical preparations against tobacco pests [J]. Agrokhimiya, 1995, 9(8): 81-86
- [10] Kabaluk J T, Goettel M, Erlandson M, et al. *Metarrhizium anisopliae* as a biological control for wireworms and a report of some other naturally-occurring parasites [J]. IOBC/WPRS Bulletin, 2005, 28(2): 109-115
- [11] 王 鹏, 张亚波, 舒金平, 等. 金龟子绿僵菌小孢变种对筛胸梳爪叩甲幼虫致病力的生物测定 [J]. 中国生物防治, 2010, 26(3): 274-279
- [12] 问锦曾, 雷仲仁, 谭正华, 等. 5 株绿僵菌对东亚飞蝗的毒力测定 [J]. 植物保护, 2003, 29(3): 50-52
- [13] 单乐天, 冯明光. 不同寄主及地理来源的 16 株绿僵菌对桃蚜的毒力比较 [J]. 微生物学报, 2006, 46(4): 602-607
- [14] Kabaluk J T, Ericsson J D. *Metarrhizium anisopliae* seed treatment increases yield of yield corn when applied for wireworm control [J]. Agronomy Journal, 2007, 99(5): 1377-1381
- [15] Ericsson, J D, Kabaluk J T, Goettel M S, et al. Spinosad interacts synergistically with the insect pathogen *Metarrhizium anisopliae* against two exotic wireworms, *Agriotes lineatus* and *A. obscurus* (Coleoptera: Elateridae) [J]. J Econ Entomol, 2007, 100(1): 31-38
- [16] 黄 勃, 樊美珍, 李增智. 绿僵菌属系统分类的研究进展 (综述) [J]. 安徽农业大学学报, 2002, 29(2): 169-172
- [17] Ansari M A, Evans M, Butt T M. Identification of pathogenic strains of entomopathogenic nematodes and fungi for wireworm control [J]. Crop Protection, 2009, 28(3): 269-272
- [18] 张亚波, 吴盼盼, 舒金平. 等. 一株绿僵菌的鉴定及其生物学特性研究 [J]. 林业科学, 2012, 48(12): 134-140
- [19] 周云娥, 白洪青, 舒金平. 筛胸梳爪叩甲生物学特性研究 [J]. 浙江林业科技, 2008, 28(4): 28-32