

文章编号: 1000-5692(2002)02-0161-05

球孢白僵菌选择性培养基的筛选和检测应用

史红霞¹, 胡明龙², 阎峻³

(1. 浙江省鄞县林业局, 浙江 宁波 315040; 2. 浙江省鄞县高桥镇林业站, 浙江 鄞县 315174; 3. 国家林业局 森林病虫害防治总站, 辽宁 沈阳 110034)

摘要: 报道了寄生球果花蝇 *Strobilomyia* spp. 的球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 选择性培养基的筛选以及应用该培养基检测土壤中球孢白僵菌动态的研究结果。为有效地检测施用球孢白僵菌防治球果花蝇的土壤中球孢白僵菌的变化, 以 Doberski 的选择性培养基为基础, 筛选出对球孢白僵菌具有较强选择性的选择性培养基, 可回收土壤中球孢白僵菌孢子达 79.5%。用该培养基检测球孢白僵菌在施菌土壤中第 2 年的存活率为 0.9%~2.8%, 它在土壤中有一定的特效性。表 4 参 6

关键词: 球孢白僵菌; 选择性培养基; 球果花蝇; 选择; 检测

中图分类号: S763.41 **文献标识码:** A

球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 作为一种重要的虫生真菌已被广泛地应用于农林害虫的生物防治。近年来, 该菌被用于防治林木种实害虫。结果表明, 此菌具有一定的应用前景。病原菌在土壤中存活时间的长短及种群数量的多少, 是影响其防治特效性的关键。土壤是一个相对复杂的环境, 病原菌受到诸多因素的影响, 特别是土壤中微生物种类较多, 数量较大, 用常规方法较难准确地检测出它在土壤中的含量。迄今, 应用较多的是利用选择性培养基快速分离和测定分生孢子。Veen 等^[1] 利用改良的 Martin 氏培养基成功地分离了球孢白僵菌和绿僵菌 *Metarhizium anisopliae*; Doberski 等^[2] 利用其设计的选择性培养基可使球孢白僵菌生长良好, 并可用于快速鉴定; Lingg^[3] 利用 Heck 发明的培养基在土壤球孢白僵菌孢子浓度大于 5×10^2 个 $\cdot g^{-1}$ 时, 回收率达 50%。高步衢等^[4,5] 报道球孢白僵菌是林木种实害虫球果花蝇 *Strobilomyia* spp. 的一种常见致病微生物。作者在总结前人试验的基础上, 进一步筛选出检测施菌土壤中球孢白僵菌分生孢子的选择性培养基, 并应用该培养基测定施菌后落叶松 *Larix gmelini* 林下球孢白僵菌的动态, 研究它在土壤中的防治特效性。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌剂 球孢白僵菌从辽宁省西丰县自然感病的球果花蝇越冬蛹中分离而得, 菌粉由河北省隆化县十八里汰球孢白僵菌厂生产, 含孢量为 50 亿个 $\cdot g^{-1}$ 。

1.1.2 供试土样及试验地 土样采自辽宁省西丰县、黑龙江省大兴安岭落叶松林中的施菌区和对照区。感病试验在辽宁省西丰县德丰林场日本落叶松 *Larix kaempferi* 母树林。

1.1.3 供试试剂 葡萄糖、蛋白胨、硫酸铜 ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)、950 $g \cdot kg^{-1}$ 五氯硝基苯 (PCNB)、高锰酸钾、结晶紫、孟加拉红、放线菌酮和氯霉素。

收稿日期: 2001-07-13; 修回日期: 2002-03-04

作者简介: 史红霞(1970-), 女, 浙江鄞县人, 工程师, 从事森林病虫害防治研究。

1.2 试验方法

1.2.1 选择性培养基的筛选 以不加染色剂(结晶紫)的 Doberski 选择性培养基作为基本培养基^[2], 加大不同剂量的杀菌物质硫酸铜、五氯硝基苯、高锰酸钾及兼有抑菌作用的染色剂结晶紫和孟加拉红, 用量见表1。氯霉素、放线菌酮和硫酸铜在培养基冷却到 40 °C 时加入, 其余物质在灭菌前加入。五氯硝基苯用乙醚溶解后加入 1 g·kg⁻¹吐温 80 制成乳剂后加入培养基。称取 1 g 菌粉放入盛有 99 mL 含 1 g·kg⁻¹吐温 80 的灭菌水中, 振荡 20 min, 取孢子液 10 mL 转入 90 mL 灭菌水中, 得到 5×10⁹ 个·L⁻¹的孢子稀释液。取土样 5 g 放入量筒, 加 5×10⁹ 个·L⁻¹孢子液 1 mL, 加水至 500 mL 搅动悬浮液, 转至 1 L 三角瓶中振荡 20 min, 在悬浮液静止前用吸管吸取 10 mL 转入 90 mL 灭菌水中得到稀释 10⁻³ 倍的土壤悬浮液, 用同样方法使之稀释至 10⁻⁴ 倍。将不同配方的培养基倒入 9 cm 的培养皿中, 每皿加入 0.5 mL 的 10⁻⁴ 倍土壤悬浮液, 采用稀释平板法检测孢子。每处理 10 皿, 3 个重复, 25 °C 保湿培养, 逐日观察生长情况。9 d 后统计结果, 在高倍解剖镜下 (8.2×10 倍) 观察鉴别球孢白僵菌。

利用筛选出的选择性培养基和 Doberski 培养基作检测球孢白僵菌的对比试验, 土壤为未施菌的落叶松林下土, 稀释方法同上, 每处理 10 皿, 6 个重复, 9 d 后检查统计目标真菌及非目标真菌及细菌菌落数。

1.2.2 施菌土壤中球孢白僵菌数量的检测 林间接种感病试验施菌量为 1~500 g·m⁻²。取林间接种感病试验处理区和对照区的土样, 用上面筛选出来的选择性培养基进行检测。第 2 年及第 3 年仍然于第 1 年取样的处理及对照区取土样, 测定球孢白僵菌在土壤中的持久性。取样方法为用直径为 4 cm 的金属采土管, 取林内落叶层下地表 5 cm 的土样。每样方取土样 3 个, 3 个重复。将每处理所取土样混合后装入塑料袋, 带回室内进行测定。土壤稀释法同上, 取样前将土壤充分搅拌均匀, 取 5 g 土样放入 1 L 三角瓶中, 加入 495 mL 含 1 g·kg⁻¹吐温 80 的灭菌水, 振荡 30 min, 把不同土样分别稀释 10⁻³, 10⁻⁴ 和 10⁻⁵ 倍, 对照区土样为 10⁻³ 倍。低剂量土样 (1~50 g·m⁻²) 为 10⁻⁴ 倍; 高剂量土样 (100~500 g·m⁻²) 为 10⁻⁵ 倍。每处理 30 皿, 9 d 统计菌落数, 计算出每克土壤中所含的孢子数。

2 结果与分析

2.1 选择性培养基的筛选结果

以 Doberski 选择性培养基检测落叶松林下土壤时, 放线菌和细菌很少, 基本不影响检测效果, 但有时非目标真菌出现数量较多, 而且有生长较快的扩展性真菌, 如毛霉和根霉等影响目标真菌的测定。为此, 在该选择性培养基的基本配方上加入了不同剂量的杀菌物质及兼有抑菌作用的染色剂, 结果见表 1。

对各处理间目标真菌的出现数 (个·皿⁻¹) 进行协方差分析, 差异极显著 ($F = 140.73 > F_{0.01} = 7.27$), 各处理间非目标真菌的出现数也存在着极显著差异 ($F = 136.58 > F_{0.01} = 7.27$), 对目标真菌及非目标真菌在各处理上出现数的平均值进行多重比较, 结果见表 2。

目标真菌出现数较多的一组中, 没有显著差异性的处理包括: 5, 1, 4, 6,

15, 12, 7。其中最好为硫酸铜 (1 g·L⁻¹), 4, 6 也为硫酸铜的另外 2 个质量浓度, 其余为高锰酸钾 (0.03 g·L⁻¹), 孟加拉红 (0.1 g·L⁻¹), 结晶紫 (0.03 g·L⁻¹) 和五氯硝基苯 (0.22 g·L⁻¹), 由此可

表 1 不同抑菌物质对球孢白僵菌检测的效果

Table 1 The inspection effect for selection of *B. bassiana* by add different inhibitors

编号	抑菌物名称	剂 量/ (g·L ⁻¹)	目标真菌数/ (个·皿 ⁻¹)	非目标真菌数/ (个·皿 ⁻¹)	扩展性真菌
1	高锰酸钾	0.03	39.2	11.5	+
2		0.10	16.8	9.4	-
3		0.30	5.2	3.5	-
4	硫酸铜	0.33	38.7	15.7	+
5		1.00	41.5	3.4	+
6		3.00	38.2	2.5	-
7	五氯硝基苯	0.22	36.7	9.9	+
8		0.67	31.4	2.2	+
9		2.01	23.3	3.2	-
10	结晶紫	0.003	29.5	14.0	+
11		0.01	33.4	11.5	+
12		0.03	36.8	7.1	+
13	孟加拉红	0.01	29.8	16.4	+
14		0.033	34.7	12.9	+
15		0.10	38.2	6.7	+

说明: + 为有快速生长的扩展性真菌, - 为无

见, 目标真菌在硫酸铜培养基上出现率较高, 说明硫酸铜对目标真菌没有显著影响。而高锰酸钾和五氯硝基苯只在低质量浓度时目标真菌出现数才较多, 说明高锰酸钾只在低质量浓度下对目标真菌的影响不显著。

但从表 1 可知, 在低质量浓度下非目标真菌的出现数也多, 说明这 2 种抑制物对目标真菌和非目标真菌的影响相关性大, 不易用于选择目标真菌。从结晶紫和孟加拉红 2 种试剂看, 在高质量浓度下目标真菌出现率较高, 而在低质量浓度下出现率则较低。如果比较这 2 种试剂对非目标真菌的影响, 可以看出, 由于低质量浓度下非目标真菌出现较多, 而且有扩展性真菌。因此, 影响目标真菌的生长, 主要是由于营养竞争, 而不是药剂本身对目标真菌的抑制作用, 因为其在高质量浓度下都可以较好生长。

从表 2 各处理对非目标真菌的影响可知, 对非目标真菌抑制较强的处理, 分别为 9, 6, 8, 5, 3, 其中有 2 个属于硫酸铜 ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 其余为高质量浓度的五氯硝基苯 ($2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.67 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 和高质量浓度的高锰酸钾 ($0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。比较上述各处理对目标真菌的影响, 高质量浓度的五氯硝基苯和高锰酸钾, 尽管对非目标真菌有很好的抑制作用, 但目标真菌也受到抑制, 因此效果较差。

从 2 种染色剂的试验结果比较, 二者对非目标真菌都有一定的作用, 但效果不是很好。它对目标真菌影响也不大, 它们的主要作用在于目标真菌在其上有便于快速鉴定的反应, 而且改变培养基的颜色, 易于统计。据报道球孢白僵菌在结晶紫培养基上菌落背面呈暗紫色, 便于快速鉴定。但本试验发现, 加入结晶紫的培养基呈紫色, 整个平板都呈暗色调, 球孢白僵菌背面的暗紫色不太明显; 而加入孟加拉红后, 培养基呈粉红色, 整个平板呈亮色调, 球孢白僵菌背面出现鲜红色, 易于鉴别。此外, 还发现寄生球果花蝇的球孢白僵菌菌株, 在加有孟加拉红的培养基上与菌落生长边缘相邻的培养基上呈现一个浅色圈, 菌落背面呈鲜红色; 生长后期, 菌落正面的菌丝上也出现浅红色, 具明显鉴别特征。

根据以上分析, 得出适于选择寄生球果花蝇球孢白僵菌的选择性培养基为葡萄糖 40 g, 再生蛋白胨 10 g, 琼脂 15 g, 硫酸铜 1 g, 孟加拉红 0.33 g, 放线菌酮 0.5 g, 氯霉素 0.5 g, 水 1 L。

用上述培养基和 Doberski 培养基检测落叶松林下土壤中球孢白僵菌。试验结果见表 3, 其中 I 为原培养基, II 为改良后的培养基。经平均数的 *t* 检验, 表明两者对目标真菌的检出

表 2 不同抑菌物对目标真菌及非目标真菌影响的显著性检验

Table 2 Significance test for target and no-target fungus in the selection media with different inhibitors

处理编号	目标真菌数 / (个·皿 ⁻¹)	差异显著性 (α=0.05)	处理编号	目标真菌数 / (个·皿 ⁻¹)	差异显著性 (α=0.05)
5	41.5	a	13	16.4	a
1	39.2	a b	4	15.7	a
4	38.7	a b	10	14.0	a b
6	38.2	a b	14	12.9	b
15	38.2	a b	1	11.5	b c
12	36.8	a b c	11	11.5	b c
7	36.7	a b c	7	9.9	c
14	34.7	b c d	2	9.4	c d
11	33.4	b c d	12	7.1	d
8	31.4	d	15	6.7	d
13	29.8	d	3	3.5	e
10	29.5	d	5	3.4	e
9	23.3	e	8	3.2	e
2	16.8	f	6	2.5	e
3	5.2	g	9	2.2	e

率。据报道球孢白僵菌在结晶紫培养基上菌落背面呈暗紫色, 便于快速鉴定。但本试验发现, 加入结晶紫的培养基呈紫色, 整个平板都呈暗色调, 球孢白僵菌背面的暗紫色不太明显; 而加入孟加拉红后, 培养基呈粉红色, 整个平板呈亮色调, 球孢白僵菌背面出现鲜红色, 易于鉴别。此外, 还发现寄生球果花蝇的球孢白僵菌菌株, 在加有孟加拉红的培养基上与菌落生长边缘相邻的培养基上呈现一个浅色圈, 菌落背面呈鲜红色; 生长后期, 菌落正面的菌丝上也出现浅红色, 具明显鉴别特征。

表 3 改良的 Doberski 培养基与原培养基的比较

Table 3 The comparison between Doberski media and improved selective media

培养基	重复	目标真菌数 / (个·皿 ⁻¹)	非目标真菌数 / (个·皿 ⁻¹)	细菌数 / (个·皿 ⁻¹)
I	1	39.6	17.2	3.2
	2	43.2	12.3	1.9
	3	40.8	9.6	2.3
	4	42.5	13.7	2.5
	5	37.2	9.9	2.2
	6	45.1	16.5	2.7
	平均	41.4	13.2	2.1
II	1	47.1	5.2	0.5
	2	42.0	5.2	0.5
	3	38.7	3.8	0.3
	4	41.5	2.9	1.2
	5	40.4	4.1	0.4
	6	42.9	4.0	0.7
	平均	42.1	3.9	0.7
<i>t</i> 检验		-	++	++

率没有显著影响,但对非目标真菌和细菌的抑制作用差异显著,改良后的培养基明显优于原配方。

2.2 施菌土壤中球孢白僵菌的含量及球果花蝇的感病率

施菌土壤中球孢白僵菌的存活率及其对球果花蝇的感病率见表4,土壤中的球孢白僵菌孢子数的对数值和死亡率的机率值进行相关分析,呈线性相关,且具有很好的相关性。回归方程为 $y=0.86+0.66x$ ($r=0.96$),说明土壤中球孢白僵菌孢子含量和第2年球果花蝇发病率呈正相关。由表4可知,土壤施菌后到第2年球果花蝇老熟幼虫下树前,即下一个感染高峰期,土壤中仍有一定数量的球孢白僵菌分生孢子,但数量较少,只有1年前的0.9%~2.8%。从它对球果花蝇的感病率看,当初始施菌量较大时,1年后对球果花蝇的寄生率仍可达到较高的水平(44.2%),但这样将会明显增加防治费用,在生产中很难达到如此大施菌剂量。在施菌剂量为 $20\text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ 时,第2年可达10.1%的感病率,虽然比对照有明显的提高,但对第3年球果花蝇种群数量作用较小。因此,利用球孢白僵菌地面施菌防治球果花蝇,只能对当年下树的球果花蝇有较高的感病率,对降低第2年球果花蝇的种群数量有一定作用,对第3年的种群数量作用较小。

3 讨论

研究表明球孢白僵菌防治球果花蝇的持效性与土壤中球孢白僵菌孢子数量密切相关,只有土壤中有足够数量的球孢白僵菌才能使球果花蝇达到较高的发病率。球孢白僵菌在土壤中的动态,取决于土壤条件,其分生孢子的存活与土壤含水量和温度密切相关^[9]。利用球孢白僵菌防治球果花蝇,施菌时间在6

表4 施菌土壤中球孢白僵菌含孢量及球果花蝇感病率

Table 4 The density of the conidia of *B. bassiana* in soil and its sustained control effect for larch cone fly

施菌量/ ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$)	3 d 后含孢量/ ($\text{个}\cdot\text{g}^{-1}$)	花蝇感 病率/ %	360 d 含孢量/ ($\text{个}\cdot\text{g}^{-1}$)	白僵菌存 活率/ %	花蝇感 病率/ %
500	4.7×10^7	58.8	4.2×10^5	0.9	42.2
100	9.9×10^6	55.9	1.2×10^5	1.2	31.1
50	4.8×10^6	54.3	9.1×10^4	1.9	17.8
20	2.0×10^6	53.3	4.6×10^4	2.3	11.1
10	8.8×10^5	51.2	2.2×10^4	2.5	6.7
1	1.0×10^5	29.8	2.8×10^3	2.8	5.6
对照	5.5×10	0	1.7×10^3	-	0

月下旬,这时正值夏季,土壤温度较高,湿度较大,虽然有利于球孢白僵菌对球果花蝇老熟幼虫的侵染,但不利于球孢白僵菌的存活。6月至10月份,土壤中温度较高,球孢白僵菌孢子将大部分失活,到第2年春季将只有较少部分存活。此外,虫生真菌在土壤中的持久性与菌株相关,筛选在土壤中宿存能力强的菌株也是增加防治持效性的一种手段。

利用球孢白僵菌防治球果花蝇尽管有一定的持效性,但随时间延长,球孢白僵菌在土壤中的存活量大量减少,不足以形成自然流行病,以长期控制球果花蝇种群的增长。在应用策略上,应将此菌作为一种微生物杀虫剂每年连续施用,才能达到较好的防治效果。

参考文献:

- [1] Veen K H, Femon P. Selectivemedia fore soil fungi *Beauveria* and *Metizium* [J]. *Invertebr Pathol*, 1966, 16: 221-226.
- [2] Doberski J W, Tribe H T. Dynamics of entomogenous fungi in soil [J]. *Trans British Mycol Soci*, 1980, 74: 95-100.
- [3] Lingg A L. Biotic and abiotic factors affecting stability of *Beauveria bassiana* [J]. *Invertebr Pathol*, 1981, 38: 191-200.
- [4] 高步衢, 杨静莉, 吴长江. 球果花蝇白僵菌开发与利用的研究[A]. 高步衢. 落叶松种实害虫防治技术论文集[C]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 1991. 67-71.
- [5] 李兰珍, 阎峻, 高步衢. 白僵菌对球果花蝇致病性研究[J]. 森林病虫通讯, 1995, (2): 15-17.
- [6] 阎峻, 李兰珍, 高步衢. 土壤温湿度对白僵菌感染球果花蝇的影响[J]. 森林病虫通讯, 1995, (3): 23-25.

Selection of culture medium of *Beauveria bassiana* parasitized in *Strobilomyia* and inspection of pathogen in soil

SHI Hong-xia¹, HU Ming-long², YAN Jun³

(1. Forest Enterprise of Yinxian County, Yinxian 315040, Zhejiang, China; 2. Forest Station of Gaoqiao Township, Yinxian 315174, Zhejiang, China; 3. General Station of Forest Pest and Disease Control, the State Forestry Administration, Shenyang 110034, Liaoning, China)

Abstract: The culture medium for *Beauveria bassiana* which parasitized in *Strobilomyia* spp. was selected based on Doberski culture medium. This media had high selection for *Beauveria bassiana*. Use of this media could collect back 79.5% of the conidia of *Beauveria bassiana* which added in to surface layer of humus. The collected rate of live conidia was 0.9%~2.8% after two years in soil. It showed that the fungi has a certain sustained effect in the soil for control *Strobilomyia* ssp.

Key words: *Beauveria bassiana*; *Strobilomyia* ssp.; selective media; selection; inspection

浙江林学院专家赴丽水开展科技下乡活动

2002年3月16日至20日,浙江林学院科研处组织从事经济林、生物技术、竹类栽培、植物资源开发和森林生态等学科的专家教授一行6人赴浙江丽水开展林业科技下乡活动。本次活动由浙江省林业局牵头,是2001年浙江省林业局部署全省百乡科技扶贫活动的具体落实。我校为丽水市的科技依托单位,分派承担该市7个县(区)37个贫困乡的扶贫任务。本次科技活动形式多样,内容丰富,既有现场洽谈咨询和培训讲座,又有实地的技术指导。林技人员和种植大户普遍反映这种活动很有针对性,农民听得懂,学得了,用得上。

3月17日专家首先参加由浙江省林业局、丽水市林业局和景宁畲族自治县人民政府共同主办的景宁林业科技下乡活动。上午,在室外活动中,专家冒雨设摊回答林农的各类实际问题,发放各类科技资料;在室内活动中,我校经济林专家王白坡教授主讲“名特优经济林丰产栽培”科技讲座,听众众多,他们边听边认真记笔记,课后争相提问,反映山区农民对科学文化知识的渴求。当天下午,景宁林业局又组织专家分别到山后干水果基地和鹤溪滩岭笋竹两用林基地作实地指导。根据各自的经营情况,专家提出存在的主要问题和因地制宜的整改措施,特别在经济林基地,专家看到这里的桃树、板栗修剪方法不当,随即操刀示范,农民深感这种面对面手把手的实地操作示范非常实用。

随后专家组一行转赴云和县,实地考察了安溪畲族乡千里雪梨基地,重河湾省级现代科技示范园区和城郊花木种植基地,对生产中存在的实际问题、园区的科学规划和进一步开发建设等分别提出指导。19日专家们又到丽水市莲都区仙度乡万亩迎庆桃基地作技术帮助,对经营中存在问题提出解决方案。20日又到青田县林业局就瓯江绿色长廊建设、毛竹林丰产栽培和油茶低产林改造等技术问题进行指导。同时还与丽水市科技局等有关部门就校地科技合作事宜进行商讨。

本次林业科技下乡活动受到各地干部群众的欢迎。本次活动共发放各类资料1000余份,开办科技讲座2个,座谈会5次,初步联系科技合作示范点和示范户5个,取得了明显成效。

(凌申坤)