

松墨天牛优良球孢白僵菌菌株生物学及毒力研究

詹伟君¹, 罗优波², 张立斌³

(1. 浙江发展园林实业有限公司, 浙江 杭州 310020; 2. 杭州市林木种苗管理中心, 浙江 杭州 310016;
3. 浙江省平阳县林业局, 浙江 平阳 325400)

摘要: 对松墨天牛 *Monochamus alternatus* 优良球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 菌株 B_{ss} 的营养生长、产孢条件以及对松墨天牛毒力进行研究。试验表明: B_{ss} 菌株营养生长温度范围为 20~30 ℃, 最适宜营养生长和产孢温度均为 25 ℃, 35 ℃下营养生长停止; 适合菌株 B_{ss} 的营养生长和产孢的培养基为 DPSA。毒力测定表明: 不同松墨天牛虫龄和虫态间感病性差异较大($P<0.05$), 虫龄越小越容易感病。B_{ss} 菌株对 3 龄幼虫的剂量—死亡率方程为 $y = -1.3884 + 0.9967x$, 致死中浓度 C_{150} 为 3.936×10^6 个孢子·L⁻¹。充分考虑了时间—剂量—死亡率之间的三维关系制作出了菌株对松墨天牛 3 龄幼虫的互补重对数(CLL)模型。图 3 表 7 参 11

关键词: 森林保护学; 松墨天牛; 球孢白僵菌; 生物学; 毒力

中图分类号: S763.3 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2013)01-0083-07

Biological and virulence study of highly pathogenic *Beauveria bassiana* on pine sawyer *Monochamus alternatus*

ZHAN Weijun¹, LUO Youbo², ZHANG Libin³

(1. Zhejiang Development Landscape Co. Ltd., Hangzhou 310020, Zhejiang, China; 2. Seedling Management Center of Hangzhou City, Hangzhou 310016, Zhejiang, China; 3. Forest Enterprise of Pingyang County, Pingyang 325400, Zhejiang, China)

Abstract: The colony growth and sporogenous conditions of the highly pathogenic strain B_{ss} of *Beauveria bassiana* on pine sawyer *Monochamus alternatus*, and the virulence of B_{ss} to pine sawyer *Monochamus alternatus* were studied. The results showed that the growth temperature for B_{ss} ranged from 20 to 30 ℃, and 25 ℃ was optimal for both colony growth and sporulation, but the colony growth stopped at 35 ℃. For growth and sporulation, DPSA was the desirable culture medium. Virulence tests indicated that great variations existed in disease susceptibility among different developmental stages of *Monochamus alternatus*, and higher disease susceptibility occurred in the juvenile stages. The equation of dose-mortality and L_{C50} of the third instar were $y = -1.3884 + 0.9967x$ and $3.936 \text{ spores} \cdot \text{mL}^{-1}$ respectively. Based on the Three-dimensional Relation of time-dosage-mortality, a complementary log-log model (CLL model) of B_{ss} virulence to third instar *M. alternatus* was constructed. [Ch, 3 fig. 7 tab. 11 ref.]

Key words: forest protection; *Monochamus alternatus*; *Beauveria bassiana*; biology; virulence

虫生真菌控制效果的好坏, 首先在于获得目标害虫的高毒力优良菌株。中国在应用球孢白僵菌防治玉米螟 *Ostrinia nubilalis* 和防治松毛虫 *Dendrolimus* spp. 方面已选育出一批优良的菌株, 并形成一套工厂化生产、商品化、产品保存以及生产防治使用的完整技术^[1-3]。松墨天牛 *Monochamus alternatus* 天然病原菌资源不少。日本早在 20 世纪 80 年代开始筛选高毒力菌株, 并探讨生产技术和防治技术, 取得了阶段性的成效^[4-5]。中国在松墨天牛白僵菌资源方面也进行了一些研究^[6-11]。本研究就松墨天牛优良菌株的营

收稿日期: 2011-12-20; 修回日期: 2012-07-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30240070); 浙江省科学技术攻关项目(2004b70023)

作者简介: 詹伟君, 从事森林资源保护工作。E-mail: zhanweijun@sohu.com

养和繁殖条件进行研究,同时建立优良菌株的毒力模型,为今后工业化生产和生产上防治应用提供背景资料。

1 材料与方法

1.1 供试优良菌株

从12个球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 菌株中,筛选出优良菌株 B_{ss} 为供试菌株^[11]。

1.2 最适生长和产孢温度的选择

以 B_{ss} 菌株为研究对象,配制葡萄糖蛋白胨马铃薯(PPDA)平板培养基平板,在中央接种带菌牙签一小段,分别置于15, 20, 25, 30, 35℃温度下培养,每处理温度各10皿,以后每天测量菌落直径大小,比较不同温度对菌落生长和产孢量的影响,筛选最适的生长和产孢温度。

1.3 培养基筛选

以平板培养为研究方法,测定各菌株的营养生长和产孢量,筛选出较适宜营养生长和产孢的培养基种类。试验设计5种固体培养基,配制方法为马铃薯培养剂(PDA):1000 mL中含去皮马铃薯200 g,葡萄糖20 g,琼脂18 g。PPDA:在PDA培养基的成分中增添蛋白胨10 g。PPSA:PPDA中葡萄糖改为蔗糖。DPSA:豆粉20 g,马铃薯200 g,蔗糖20 g,琼脂20 g,蒸馏水1000 mL。Czapek:硝酸钠(NaNO₃)3 g,磷酸氢二钾(K₂HPO₄)1 g,硫酸镁(MgSO₄·7H₂O)0.5 g,氯化钾(KCl)0.5 g,硫酸亚铁(FeSO₄·7H₂O)0.01 g,蔗糖30 g,琼脂15 g,蒸馏水1000 mL。

接种方法同上,10皿·处理⁻¹,在25℃下培养,以后测定菌落生长直径1次·d⁻¹。至15 d时,测定单位面积(mm²)上的产孢量,统计分析不同培养基上营养生长和产孢量,得出最适宜的培养基。

1.4 不同虫龄和虫态松墨天牛的时间—死亡率毒力测定

采自浙江余杭的松墨天牛2龄幼虫、3龄幼虫和成虫作为供试对象,以优良菌株 B_{ss} 为供试菌株。在PPDA培养基上培养 B_{ss} 菌株,2周后获得大量的分生孢子,以1.0 g·kg⁻¹吐温-80的无菌水配制比例为1.0×10⁷孢子悬浮液,用微量注射器在每头松墨天牛体表上接种50 μL的孢子悬浮液,然后把松墨天牛置于小试管中,小试管内装有松木屑,试管口用湿棉花保湿,1支试管1头虫,接种每虫龄松墨天牛20头,即20个重复。最后置于25℃的培养箱内饲养,以后逐天观察记录松墨天牛存活和白僵情况。最后统计分析比较 B_{ss} 菌株对不同虫龄和虫态松墨天牛的毒力。

1.5 时间—剂量—死亡模型(CLL模型)建立

菌株:以优良菌株 B_{ss} 为供试菌株,在PPDA平板上25℃培养7 d,配制孢子悬浮液,稀释成1.0×10¹¹, 1.0×10¹⁰, 0.5×10¹⁰, 1.0×10⁹, 0.5×10⁹, 1.0×10⁸和1.0×10⁷孢子·L⁻¹的系列比例。

生物测定:各个比例剂量处理20头松墨天牛(3龄)幼虫,接种方法同上,接种量为50 μL·头⁻¹,接种后置于25℃下饲养,逐日观察死亡和白僵情况。

数据分析:采用CLL模型即互补重对数模型(complementary log-log model)分析方法^[12],将时间和剂量统一到同一个模型中来,建立 B_{ss} 对3龄松墨天牛 CLL毒力模型。

2 结果与分析

2.1 B_{ss} 菌株最适生长温度

测试5个温度下 B_{ss} 菌株菌落生长直径,结果见表1。

表1可知:温度对 B_{ss} 菌株生长影响较大,尤其是高温。对生长15和17 d菌落直径进行方差分析,各温度间 B_{ss} 菌落生长直径存在显著差异($P < 0.05$),25℃下生最快,其次是20,30和15℃。35℃下 B_{ss} 几乎不生长。试验表明25℃是营养生长最适宜温度,35℃是白僵菌 B_{ss} 菌株营养生长极限温度。因此,在夏季高温季节使用白僵菌防治松墨天牛,其效果会受影响。

2.2 不同培养基菌落生长的比较

25℃下在5种培养基上测定其菌落生长直径,结果见表2。

从表2分析: B_{ss} 菌株在DPSA培养基上菌落生长最快,13 d时为45.63 mm;其次是在PPDA和在PPSA上生长相当;而在Czapek培养基上生长较慢,Czapek不适用于培养白僵菌。对生长11 d和13 d

表 1 不同温度下 B_{ks} 菌落生长直径Table 1 Colony growth diameter of B_{ks} strain under different temperatures

温度/ °C	菌落直径/mm							
	3	5	7	9	11	13	15	17 d
15	3.33 ± 0.22 b	5.30 ± 0.15 c	8.62 ± 0.21 c	11.85 ± 0.17 d	14.54 ± 0.22 c	17.03 ± 0.28 c	20.51 ± 0.33 d	21.19 ± 0.36 d
20	3.14 ± 0.19 b	8.98 ± 0.18 b	12.46 ± 0.23 b	18.03 ± 0.19 c	22.11 ± 0.23 b	26.27 ± 0.29 b	28.53 ± 0.35 b	34.19 ± 0.38 b
25	5.85 ± 0.023 a	12.02 ± 0.17 a	19.15 ± 0.16 a	24.54 ± 0.16 a	26.14 ± 0.24 a	33.90 ± 0.30 a	38.73 ± 0.36 a	43.78 ± 0.37 a
30	3.41 ± 0.18 b	11.17 ± 0.20 a	17.62 ± 0.17 ab	21.25 ± 0.23 b	24.55 ± 0.26 b	25.59 ± 0.31 b	27.76 ± 0.45 c	31.00 ± 0.35 c
35	1.59 ± 0.24 c	1.86 ± 0.22 d	2.00 ± 0.15 d	2.08 ± 0.22 e	2.11 ± 0.27 d	2.22 ± 0.32 d	2.75 ± 0.40 e	3.02 ± 0.27 e

说明: 表中同列数据标不同字母者, 表示在 95% 水平有显著差异。

表 2 不同培养基上菌落生长的比较

Table 2 Colony growth of B_{ks} strains on different media

培养基	菌落生长直径/mm				
	5	7	9	11	13 d
PDA	15.70 ± 0.22 b	21.47 ± 0.26 b	24.38 ± 0.28 b	28.95 ± 0.29 b	31.43 ± 0.33 b
PPDA	14.99 ± 0.21 b	19.52 ± 0.24 c	24.99 ± 0.29 b	29.64 ± 0.30 b	34.04 ± 0.28 b
PPSA	14.44 ± 0.19 b	19.02 ± 0.28 c	24.24 ± 0.28 b	28.70 ± 0.33 b	34.54 ± 0.36 b
DPSA	21.31 ± 0.18 a	24.91 ± 0.27 a	31.08 ± 0.28 a	40.26 ± 0.35 a	45.63 ± 0.37 a
Czapek	6.70 ± 0.15 c	12.24 ± 0.22 d	18.09 ± 0.21 c	22.70 ± 0.36 c	28.70 ± 0.38 c

说明: 表中同列数据标不同字母者, 表示在 95% 水平有显著差异。

菌落直径进行方差分析也表明, B_{ks} 菌株在不同培养基间菌落生长直径存在显著性差异 ($P < 0.05$)。在 DPSA 上生长显著优于其他培养基; PDA, PPDA 和 PPSA 之间不存在显著差异; 而在 Czapek 培养基上生长最慢, 显著差于其他 4 种培养基。

2.3 白僵菌产孢最适温度选择

B_{ks} 菌株在 PPDA 平板培养基上不同温度下培养 15 d 时, 测定每平方毫米上产孢量见表 3。从表 3 可知, 不同温度下 B_{ks} 菌株产孢量差异很大。方差分析表明不同温度间均存在显著性差异 ($P < 0.05$)。25 °C 下培养, 产孢量最高达 2.01×10^6 个孢子·mm⁻², 是 20 °C 下的 2 倍, 是 15 °C 下培养的 5 倍, 是 30 °C 下约 10 倍之多。

与 B_{ks} 最适营养生长温度相比较, 最适生长温度和产孢温度是一致的, 均以 25 °C 为最佳。

表 3 不同温度下 B_{ks} 产孢量比较Table 3 Sporogenous ability of B_{ks} strain under different temperature

温度/°C	产孢量/($\times 10^6$ 孢子·mm ⁻²)			
	重复 I	重复 II	重复 III	平均
15	0.37	0.42	0.44	0.41 c
20	1.09	0.89	1.06	1.01 b
25	2.01	2.08	1.95	2.01 a
30	0.19	0.20	0.12	0.19 d

说明: 表中同列数据标不同字母者, 表示在 95% 水平有显著差异。

2.4 菌株产孢培养基筛选

测定在 PDA, PPDA, PPSA, DPSA 和 Czapek 培养基上, 25 °C 下 15 d 时的产孢量见表 4。从表 4 可知, B_{ks} 菌株在 DPSA 平板培养基上产孢量最高, 为 23.69×10^7 个孢子·cm⁻², 显著高于其他 4 种培养基上的产孢量。其次是 PPDA 和 PDA 培养基上产孢量, 它们又显著高于 PPSA 和 Czapek 培养基上的产孢量。而 Czapek 上产孢量最低, 显著低于其他 4 种培养基。这结果与白僵菌营养生长最适培养基是一致的,

表4 不同培养基上 B_{xs} 的产孢量比较Table 4 Sporogenous ability of B_{xs} strains on different media

培养基	菌株	产孢量/($\times 10^7$ 个孢子 \cdot cm $^{-2}$)			
		重复 I	重复 II	重复 III	平均
PDA	B_{xs}	25.34	21.60	18.87	21.94 b
PPDA	B_{xs}	20.61	18.37	15.89	18.29 b
PPSA	B_{xs}	11.67	8.19	10.43	10.10 c
DPSA	B_{xs}	25.63	25.08	20.36	23.69 a
Czapek	B_{xs}	5.71	6.46	7.45	6.54 d

说明：表中同列数据标不同字母者，表示在 95%水平有显著差异。

即 DPSA 既适宜于营养生长又适宜于产孢，是较理想的培养基。

2.5 不同虫态松墨天牛的时间—死亡率毒力方程

B_{xs} 菌株对 2 龄幼虫、3 龄幼虫和成虫进行的毒力测定，得出不同虫龄和虫态的时间—死亡率毒力方程和致死中时 T_{150} (表 5)。

表5 B_{xs} 菌株对松墨天牛的时间—死亡率毒力方程Table 5 Time-virulence regression equation of strain B_{xs} to *M. alternatus*

虫龄、虫态	毒力方程	相关系数	T_{150}	置信限(低)	置信限(高)
2 龄	$y=1.0729+0.1873x$	0.9422	102.19	94.86	138.51
3 龄	$y=1.6151+0.1215x$	0.9731	166.96	143.72	193.96
成虫	$y=1.9999+0.1387x$	0.9752	493.63	420.53	579.96

表 5 可知：时间与累积死亡率之间存在显著的关系。比较 T_{150} 数据，不同虫龄和虫态间差异很大，虫龄越小致死中时越小，2 龄为 102.19 h，3 龄为 166.96 h，而成虫需很长时间达 493.63 h。说明不同虫龄和虫态感病性不一致，虫龄越小越容易感病。

2.6 各种浓度下时间—死亡率毒力方程

B_{xs} 菌株在 1.0×10^{11} 、 1.0×10^{10} 、 0.5×10^{10} 、 1.0×10^9 、 0.5×10^9 、 1.0×10^8 和 1.0×10^7 个孢子 \cdot L $^{-1}$ 浓度下对 3 龄松墨天牛幼虫的毒力(表 6)，其数据同样按上述方法处理，得出 B_{xs} 菌株剂量—死亡率的毒力模型图及方程，见图 1。 B_{xs} 菌株的剂量—死亡率方程为 $y=-1.3884+0.9967x$ ，致死中浓度 C_{150} 为 3.936×10^6 个孢子 \cdot L $^{-1}$ 。

表6 B_{xs} 菌株不同剂量对松墨天牛 3 龄幼虫的毒力Table 6 Virulence of B_{xs} strain on 3 instar larva under different dose

孢子浓度/ (孢子 \cdot L $^{-1}$)	供试 虫数	死亡数/校正死亡率								
		4	6	8	10	12	14	16	18	20 d
1.0×10^{11}	20	25/25.00	45/45.00	70/66.67	85/82.35	100/100	100/100	100/100	100/100	100/100
1.0×10^{10}	20	20/20.00	40/40.00	60/55.56	75/70.59	90/87.50	100/100	100/100	100/100	100/100
0.5×10^{10}	20	10/10.00	25/25.00	45/38.89	60/52.94	80/75.00	95/93.33	100/100	100/100	100/100
1.0×10^9	20	10/10.00	25/25.00	40/33.33	50/41.18	75/68.75	90/86.67	95/92.86	100/100	100/100
0.5×10^9	20	5/5.00	15/15.00	30/22.22	50/41.18	70/62.50	80/73.33	90/85.71	100/100	100/100
1.0×10^8	20	0/0	0/0	20/11.11	40/29.41	55/43.75	70/60.00	85/78.57	95/92.86	95/92.86
1.0×10^7	20	0/0	0/0	15/5.56	25/11.76	40/25.00	45/26.67	55/35.71	70/57.14	75/64.29
ck	20	0	0	10	15	20	25	30	30	30

2.7 B_{xs} 菌株时间—剂量—死亡率(CLL)模型

用机率分析的方法，分别对剂量或时间作线性回归分析，通过回归参数的估计而建立直线回归模

型，从而估计剂量或时间效应。这样的分析方法使时间与剂量的效应相互分开，无法使所建模型充分体现实验数据的完整性。由于时间和剂量的效应相互分开，无法精确描述供试因子(如农药或生物制剂)的活性，而且在固定剂量下随时间变化的死亡率值不是独立的，而是相关的。因此，有必要研究 CLL 模型，同时考察时间效应和剂量效应，这样更能体现出生测数据的直观性和客观性。

不同浓度对幼虫的毒力数据见表 6。经 CLL 模型处理数据，得出 CLL 模型 I 和模型 II 的各种参数(表 7)。根据表 7 的参数，用模型 I 可以形象直观地描述 B_{xs} 菌株对 3 龄松墨天牛幼虫的累积死亡率随时间和浓度的变化趋势(图 2)。在记录的时间范围和浓度范围内，天牛幼虫之累积死亡率是一个随时间和浓度而变化的曲面，根据曲面的高度和变化趋势，可以看出菌株的毒力强弱。同时，根据各参数，制作出 B_{xs} 菌株的 CLL 模型软件工具，一旦输入时间和剂量浓度，就直接得出死亡率结果。

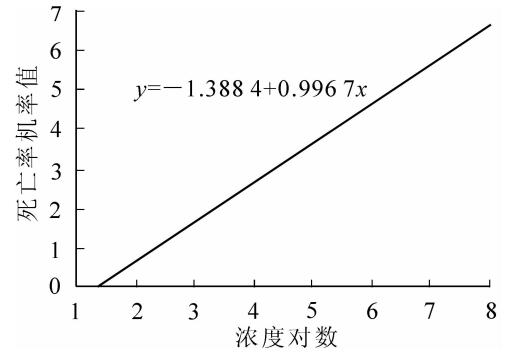


图 1 松墨天牛 3 龄幼虫被 B_{xs} 菌株感染后的剂量死亡率回归直线

Figure 1 Dose-virulence equation of *M. alternatus* larva infected by B_{xs} strain

表 7 松墨天牛 3 龄幼虫对 B_{xs} 菌株时间-剂量-死亡率模型的模拟与参数估计

Table 7 Simulation and parameter estimation of B_{xs} strain for complementary log-log model

模型 II 参数	均值 ± 标准差	模型 I 参数	均值 ± 标准差
$\hat{\beta}$	9.834 6 ± 0.480 9	$\hat{\beta}$	9.834 6 ± 0.231 3
$\hat{\gamma}_2$	-10.160 3 ± 0.409 3	$\hat{\tau}_2$	-10.160 3 ± 0.167 5
$\hat{\gamma}_3$	-9.828 2 ± 0.396 4	$\hat{\tau}_3$	-9.287 4 ± 0.153 5
$\hat{\gamma}_4$	-9.545 3 ± 0.382 3	$\hat{\tau}_4$	-8.714 9 ± 0.141 3
$\hat{\gamma}_5$	-9.103 0 ± 0.370 8	$\hat{\tau}_5$	-8.197 1 ± 0.136 6
$\hat{\gamma}_6$	-8.238 6 ± 0.396 0	$\hat{\tau}_6$	-7.524 5 ± 0.143 5
$\hat{\gamma}_7$	-8.038 2 ± 0.362 9	$\hat{\tau}_7$	-7.055 5 ± 0.136 2
$\hat{\gamma}_8$	-7.702 7 ± 0.378 8	$\hat{\tau}_8$	-6.634 5 ± 0.133 1
$\hat{\gamma}_9$	-6.659 6 ± 0.385 7	$\hat{\tau}_9$	-5.953 9 ± 0.130 1
$\hat{\gamma}_{10}$	-8.009 7 ± 0.474 6	$\hat{\tau}_{10}$	-5.833 4 ± 0.126 9

根据 CLL 模型考察死亡概率与浓度的关系，参照唐启义等^[8]求 $\lg T_{150}$ 和 $\lg T_{190}$ 的方法求出 B_{xs} 菌株的天牛幼虫随时间变化的 $\lg C_{150}$ 和 $\lg C_{190}$ 及其 95% 置信限(图 3)。从图 3 中可以看出： $\lg C_{150}$ 和 $\lg C_{190}$ 在接种处理后前 15 d 内变化最大，此后，变化趋于平缓。所以根据浓度效应比较各菌株毒力相对强弱时最好选择接种处理后 15 d 至 20 d 的数据。

3 小结与讨论

试验表明优良球孢白僵菌菌株 B_{xs} 营养生长温度范围为 20~30 ℃，最适宜温度为 25 ℃，35 ℃ 下不生长。这与前人研究结果相一致^[10]。白僵菌适宜生长温度范围在 20~30 ℃，最适为 25 ℃，极限生长温度是 5 ℃ 和 35 ℃。

一般来说，同一种虫生真菌发育的不同时期，如菌丝生长期和产孢期的最适温度不尽相同^[11]。研究表明，白僵菌 B_{xs} 菌株的产孢最适温度与菌丝生长温度一致，均为 25 ℃。在 25 ℃ 下其产孢量是在 20 ℃ 下的 2 倍，是 15 ℃ 下的 5 倍，是 30 ℃ 下的 10 倍。徐庆丰等^[13]报道白僵菌营养生长和产孢最适温度也是 25 ℃。

比较在 5 种培养基上 B_{xs} 菌株的营养生长和产孢量，表明不同培养基间存在明显差异。DPSA 是最好培养基，既适合 B_{xs} 的营养生长，又适合于产孢。说明在培养基中添加豆粉等天然基质有利于菌丝生

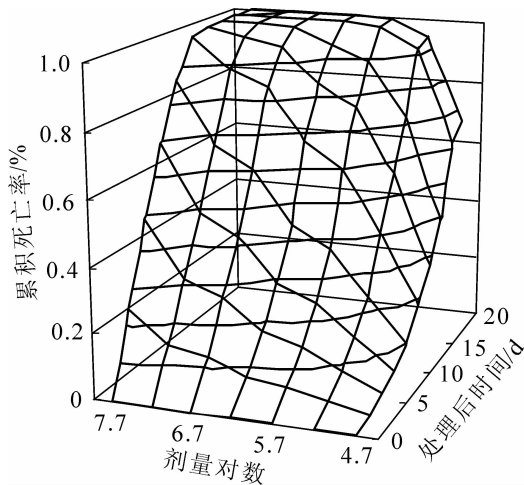


图2 由CLL模型得出的 B_{ss} 作用下松墨天牛幼虫随时间和浓度的累积死亡率曲面
Figure 2 Time-dose-virulence complemently log-log model of B_{ss} strain to *M. alternatus*

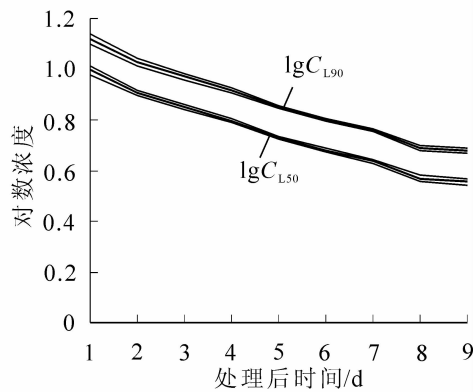


图3 B_{ss} 菌株对松墨天牛3龄幼虫 $\lg C_{L50}$ 和 $\lg C_{L90}$ 及其95%置信限
Figure 3 $\lg L_{C50}$, $\lg L_{C90}$ and 95% incredible limit of B_{ss} CLL model

长和产孢。前人也有类似的报道^[11]。白僵菌一般在葡萄糖、蔗糖、果糖，可溶性淀粉为碳源的培养基上，都能很好地生长和产孢，但在以 $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 葡萄糖为碳源的培养基上，产孢量较高。本研究结果与之相一致， B_{ss} 菌株在PPDA，PDA和PPSA培养基上营养生长无差异，但产孢量在PPDA上明显高于PPSA。说明单糖比双糖、多糖有利于吸收。

试验表明：Czapek培养基效果最差，既不适宜于 B_{ss} 菌株的营养生长，又不适宜于产孢。一般认为氮源中有机氮源比无机氮源好，有利于生长和产孢。Czapek培养基中氮源是无机氮源，碳源是双糖，因此，菌株营养生长和产孢均不好。

虫生真菌的生长和繁殖与营养及环境因子密切相关，碳源、氮源、矿物质和微量元素是生长发育的基础。除营养物质外，还需要一定的环境条件，如温度、湿度、pH和光照等。每种环境因子对生长发育都有其最适点、最高限和最低限。因此，今后对 B_{ss} 菌株还待全面深入地展开多方面的研究。

在 B_{ss} 菌株对松墨天牛2龄幼虫、3龄幼虫和成虫试验期间死亡率的生测数据分析，比较 L_{T50} 数据，不同虫龄和虫态间差异很大，虫龄越小致死中时越小，说明不同虫龄和虫态感病性不一致，越幼小越容易感病。

对 B_{ss} 菌株在 1.0×10^{11} ， 1.0×10^{10} ， 0.5×10^{10} ， 1.0×10^9 ， 0.5×10^9 ， 1.0×10^8 和 1.0×10^7 个孢子 $\cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下受试松墨天牛3龄幼虫在试验期间死亡率的生测数据分析，将累计死亡率进行机率值转换后，分别对浓度对数或时间对数作线性回归分析，通过回归参数的估计，建立各种浓度下时间-死亡率，及菌株剂量浓度-死亡率直线回归模型，并估计其 T_{L50} 和 C_{L50} 。分析 T_{L50} ， B_{ss} 菌株随着接种浓度的加大， T_{L50} 越小，说明毒力增强。

时间-死亡率或剂量-死亡率模型有明显的缺陷，这种模型分析使时间与剂量的效应相互分开，无法使所建模型充分体现完整性。实际上时间、剂量两因素是相互影响、相互统一的。因此有必要将时间和剂量的效应统一到同一个模型(时间-剂量-死亡率模型(CLL模型))中来。

本研究采用不同浓度的孢子悬浮液对松墨天牛3龄幼虫生物测定，其数据经CLL模型处理，得出该模型的各种参数，并制作各菌株CLL模型软件工具，用该工具或用模型公式计算剂量和时间效应指标。并绘制出累积死亡率随时间和浓度变化而变化的曲面图，根据曲面的高度和变化趋势，可以直观地看出菌株的毒力强弱。根据该模型可以计算出不同时间区间内的 L_{C50} 和 L_{C90} 以及95%置信限，从而比较菌株的毒力强弱。

CLL模型不仅能得到传统分析方法所产生的重要信息 C_{L50} 和 T_{L50} ，还能给出剂量效应随时间变化及时间效应随剂量变化趋势信息，这在毒力分析上是一个很重要的补充。该模型最突出的优点是充分考虑了时间-剂量-死亡率之间的三维关系，把时间效应和剂量效应结合起来进行综合分析评价等，因而能克

服传统分析方法中因降维丢失部分信息的缺陷, 使分析结果更客观、更全面。

利用 CLL 模型可以很方便地比较出各个菌株的相对毒力强弱, 也可以单独考察时间效应或剂量效应。然而与传统分析方法比较, 这种分析方法用起来更复杂, 必须借助计算机程序的运行, 但在目前计算机已经普及应用的情况下, 这已经不成为障碍了。

参考文献:

- [1] 丁珊, 孙继美, 肖华, 等. 筛选球孢白僵菌菌株的试验[J]. 森林病虫通讯, 1997 (3): 13 - 15.
DING Shan, SUN Jimei, XIAO Hua, *et al.* Experiments of selecting of *Beauveria bassiana* [J]. *China For Pest Dis*, 1997 (3): 13 - 15.
- [2] 王成树, 王四宝, 李增智. 球孢白僵菌高毒株筛选模型的研究[J]. 农业生物技术学报, 1998, 6 (3): 245 - 249.
WANG Chengshu, WANG Sibao, LI Zhengzhi. Screening model for selecting virulent strains of *Beauveria bassiana* [J]. *J Agric Biotechnol*, 1998, 6 (3): 245 - 249.
- [3] 王成树, 樊美珍, 李增智. 球孢白僵菌标准菌株的筛选及毒力效价的评定[J]. 安徽农业大学学报, 1999, 26 (2): 130 - 134.
WANG Chengshu, FAN Meizhen, LI Zengzhi. Standard strain selection and virulence titer assessment of *Beauveria bassiana* [J]. *J Anhui Agric Univ*, 1999, 26 (2): 130 - 134.
- [4] SHIMAZU 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.
- [5] 冯明光, 唐启义, 胡国成, 等. 球孢白僵菌对 7 种蚜虫的感染反应—时间—剂量—死亡率模型分析[J]. 应用基础与工程科学学报, 1996, 4 (1): 22 - 23.
FENG Mingguang, TANG Qiyi, HU Guocheng, *et al.* Susceptibility of seven species of aphids to a *Beauveria Bassiana* isolate —analysis of time dose—mortality model [J]. *J Basic Sci Eng*, 1996, 4 (1): 22 - 23.
- [6] 杨毅, 周祖基, 张立钦. 寄生松墨天牛的球孢白僵菌不同菌株 DNA 多态性的 RAPD 分析[J]. 浙江林学院学报, 2005, 22 (3): 306 - 309.
YANG Yi, ZHOU Zuji, ZHANG Liqin. RAPD analysis of DNA polymorphism of parasitic *Beauveria bassiana* in *Monochamus alternatus* [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2005, 22 (3): 306 - 309.
- [7] 徐庆丰. 白僵菌的生物学、制剂生产及其应用[G]//农牧渔业部植物保护总站. 中国生物防治的进展. 北京: 农业出版社, 1984: 405 - 423.
- [8] 张立钦, 吴鸿, 刘军. 松墨天牛优良白僵菌菌株筛选[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2000, 24 (2): 33 - 37.
ZHANG Liqin, WU Hong, LIU Jun. The screening virulent strain of *Beauveria bassiana* to *Monochamus alternatus* [J]. *J Nanjing For Uni Nat Sci Ed*, 2000, 24 (2): 33 - 37.
- [9] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其计算机处理平台[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 22 - 40.
- [10] 徐庆丰. 白僵菌的生物学、制剂生产及其应用, 中国生物防治的进展[M]. 北京: 农业出版社, 1984: 405 - 423.
- [11] 蒲蛰龙, 李增智. 昆虫真菌学[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1996: 55 - 65.