

Fatality Rate and Pathogenic Process Observation of *Melolontha hippocastani mongolica* Infection by *Beauveria brongniartii*

Yujue Zhou¹, Min Wang¹, Hui Zhang¹, Zuji Zhou², Xiaoying Long²

¹Sichuan Agricultural University, Chengdu Sichuan

²Sichuan Ivmeng forestry Co., Ltd, Chengdu Sichuan

Email: yason2000@163.com

Received: Apr. 8th, 2020; accepted: Apr. 23rd, 2020; published: Apr. 30th, 2020

Abstract

To reveal the toxicity of the *Beauveria brongniartii* to the soil pest *Melolontha hippocastani mongolica* which seriously threatens to the production of the fritillaries, though the vaccination experiment of *Beauveria brongniartii* to the *Melolontha hippocastani mongolica* on their different stage, including one to three larvae stage and the adults, significantly different mortality rates were shown in different stages. The analysis indicated that the *Beauveria brongniartii* has significant cytotoxicity to the 1st and 2nd larvae of *Melolontha hippocastani mongolica* which fatality rate up to $93.3\% \pm 0.1745$ and $66.7\% \pm 0.1434$. While it's invalid to the 3rd in star and adults, the corresponding value is $25.1\% \pm 0.0598$ and $2.77\% \pm 0.0148$. Data shows that there was a significant positive correlation between mortality and temperature in the 2nd larva under 12 to 20 Centigrade. So, the conclusion is that the *Beauveria brongniartii* can be applied in the bio-control of the *Melolontha hippocastani mongolica* in their younger lava stage as a possibly potential bio-pesticide, especially in higher temperature.

Keywords

Beauveria brongniartii, *Melolontha hippocastani mongolica*, Cytotoxicity Test, Pathogenic, Mortality Rate

布氏白僵菌对大栗鳃金龟的致死能力测试

周宇燊¹, 王敏¹, 张慧¹, 周祖基², 龙晓英²

¹四川农业大学, 四川 成都

²四川绿盟林业有限公司, 四川 成都

Email: yason2000@163.com

摘要

从野外病亡的大栗鳃金龟 *Melolontha hippocastani mongolica* 体内分离出了疑似病原物, 经鉴定为布氏白僵菌 *Beauveria brongniartii*。为了明确布氏白僵菌对大栗鳃金龟不同虫龄幼虫的致死能力, 实验采用了拌土法和直接喷洒法将布氏白僵菌孢子接种到不同虫龄的大栗鳃金龟幼虫, 并定期观察期死亡率。结果表明: 布氏白僵菌对大栗鳃金龟1龄和2龄幼虫的致死率与对照具有显著差异, 且具有较强致死能力, 35 d时最高达到了 $93.3\% \pm 0.1745$ 和 $66.7\% \pm 0.1434$; 大栗鳃金龟3龄幼虫和成虫的致死率最高仅为 $25.1\% \pm 0.0598$ 和 $2.22\% \pm 0.0148$, 与对照和低龄幼虫均有显著性差异; 并且土壤温度和致死率呈高度正相关, $12^{\circ}\text{C} \sim 20^{\circ}\text{C}$ 范围内, 观测所得的决定系数(R^2)分别为 0.97267 ; 0.99725 ; 0.98256 ; 0.96223 ; 0.92550 。因此, 布氏白僵菌在生产上有作为生物杀虫剂的巨大潜力, 可用于鳃金龟低龄幼虫的生物防治, 具体的方式方法还有待于进一步深入研究。

关键词

布氏白僵菌, 大栗鳃金龟, 毒力测试, 致病, 死亡率

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

中药川贝主要用于平喘镇咳, 其生物学本质是贝母属植物的干燥鳞茎, 包括暗紫贝母 *Fritillariae unibracteatae*, 川贝母 *Fritillaria cirrhosa*, 梭砂贝母 *Fritillariae delavayi* 和甘肃贝母 *Fritillariae przewalskii* 等几个常见种。近年来优质川贝母的市场价格高达 1000 元/kg 以上, 成为中药材中价格最昂贵的根茎类药材之一。在四川甘孜, 川贝母的生产受到地下害虫的严重侵扰, 经调查发现, 大栗鳃金龟 *Melolontha hippocastaneamongolica* 是最主要的地下害虫。布氏白僵菌从野外病亡的大栗鳃金龟幼虫体内分离得到, 并经过科赫实验验证了的致死性病原物。目前国内并无关于大栗鳃金龟的生物防治试验, 我们尝试利用布氏白僵菌对大栗鳃金龟进行了毒力试验, 并观察了其感病过程。

2. 材料与方法

供试菌种: 布氏白僵菌 *Beauveria brongniartii*, 菌株分离自病亡的大栗鳃金龟幼虫, 由四川农业大学森林保护实验室培养提供。

供试虫: 大栗鳃金龟 1~3 龄幼虫、成虫。采自康定折多山。其中被测试 2 龄幼虫平均头宽 2 mm, 3 龄幼虫的平均头宽 6 mm。饲养介质均为原生地的土壤经 120°C 灭菌 30 min 至无菌状态, 自然冷却后使用。

仪器设备: 人工气候箱(型号 RXZ-300C)、洁净工作台(苏州净化 SW-CJ-1F)、普通光学显微镜(奥林巴斯 BX41)。

菌液制备: 取 3~5 皿已培养好且产孢充分的布氏白僵菌, 将孢子粉用 10 mL 0.1% 的吐温-80 无菌水溶液冲洗完全洗脱, 1500 rpm 离心浓缩后, 弃去部分上清液, 再用磁力搅拌器充分搅拌均匀。配制成孢

子悬液后,在400倍显微镜下经血球计数板计数,配制成孢子浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ (侵染幼虫用)和 $1 \times 10^8/\text{mL}$ (侵染成虫用)的两种孢子悬液备用。

饲料准备与饲养:先将贝母根茎用清水洗净,用75%酒精浸泡消毒,浸泡时间30 s,取出后在超净工作台通风,使酒精彻底挥发,然后均匀拌入土中供大栗鳃金龟食用。每个玻璃瓶中(直径10 cm,高12 cm)加入25 g贝母根茎。

喷洒法:在饲养瓶中加入害虫原产地采集的土壤,用牛皮纸封口,125~130℃高压灭菌30 min,在超净工作台上用喷雾器将已配好备用的孢子菌液均匀喷施到虫体表面或者卵表面,每瓶用量1.5~2.0 mL。以喷洒同样量无菌水处理的作为对照。

拌土法:同样方法处理后,在超净工作台上用喷雾器将配好的孢子悬浮液均匀喷施到土表,并搅拌15 min至均匀,每瓶用量10 mL。以喷洒10 mL无菌水处理的作为对照。

对大栗鳃金龟幼虫的处理:3种虫龄(1龄,2龄,3龄)的幼虫每次参试数量分别30头,12头,12头。各重复3次。以无菌水处理的作为对照,置于温度20℃的培养箱中。每7 d统计一次死亡率,统计至第35 d。死亡幼虫单独存放,并观察后期虫体表面的菌丝特征是否符合白僵菌的特征。

大栗鳃金龟成虫的处理:将配好的孢子浓度为 $1 \times 10^8/\text{mL}$ 的菌液均匀喷施到虫体表面,每瓶用量0.5 mL,每瓶1头虫,每组15头,重复3次。以喷0.5 mL无菌水处理的作为对照。置于温度20℃的培养箱中。每7 d统计一次死亡率,35 d后统计最终死亡率。

感病过程观察:大栗鳃金龟2龄幼虫置于广口瓶中,饲养温度20℃,每瓶5头。每瓶用菌液用量均为20 mL,每瓶5头虫。每2~3天抽取一次血淋巴在显微镜下观察其感菌情况,并拍照保存。温度对白僵菌的毒力影响:均采用拌土接种法,以接种后35 d的死亡率为考察指标,分别观察并土壤温度在20℃,18℃,16℃,14℃,12℃下白僵菌的毒力变化。样本为2龄鳃金龟幼虫,接种后至于人工气候箱中,处理数为 10×3 。

所有数据处理均采用SPSS 18.0完成。

3. 结果与分析

3.1. 布氏白僵菌对大栗鳃金龟的致死率统计

整体而言布氏白僵菌对大栗鳃金龟的低龄幼虫有着较高的致死效率,布氏白僵菌对各阶段大栗鳃金龟的致死率具体数据见表1。

Table 1. Mortality rate of the *Melolontha hippocastani mongolica* infected by *Beauveria brongniartii*
表 1. 布氏白僵菌对大栗鳃金龟的致死率

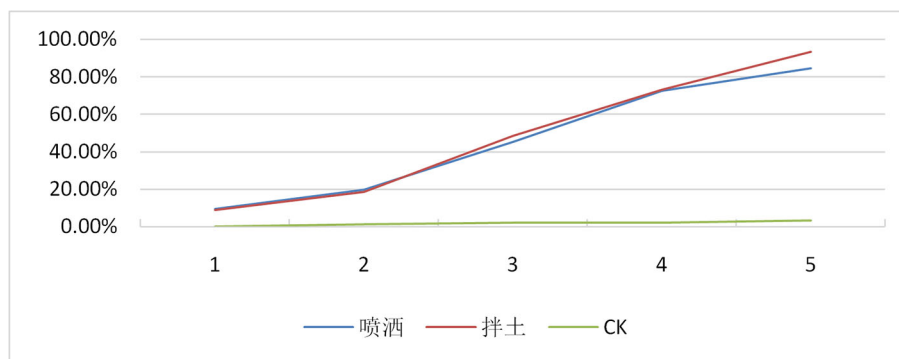
样本类型 sample types	处理方法 treatment	处理数 sample numbers	平均死亡率 average mortality				
			7d	14d	21d	28d	35d
1龄幼虫 1 st instar	喷洒法 spraying	3 × 30	9.50% ± 0.0161	19.60% ± 0.0378	45.20% ± 0.0791	72.50% ± 0.1435	84.43% ^B ± 0.1537
	拌土法 soilmixed	3 × 30	8.90% ± 0.0147	18.70% ± 0.0367	48.50% ± 0.0781	73.20% ± 0.1464	93.33% ^B ± 0.1745
	对照 CK	3 × 30	0%	1.10% ± 0.0022	2.20% ± 0.0050	2.20% ± 0.0047	3.3% ^A ± 0.0064
2龄幼虫 2 nd instar	喷洒法 spraying	3 × 12	7.10% ± 0.0113	12.50% ± 0.0280	26.50% ± 0.0533	34.30% ± 0.0792	47.2% ^B ± 0.1067
	拌土法 soil mixed	3 × 12	8.20% ± 0.0150	17.5% ± 0.0409	25% ± 0.0510	42% ± 0.1008	66.7% ^B ± 0.1434
	对照 CK	3 × 12	2.80% ± 0.005	2.80% ± 0.0042	5.60% ± 0.0106	5.60% ± 0.0123	8.3% ^A ± 0.0199

Continued

3 龄幼虫 3 rd instar	喷洒法 spraying	3 × 12	8.30% ± 0.0136	15.20% ± 0.0401	19.50% ± 0.0425	21.50% ± 0.0426	25.10% ^a ± 0.0598
	拌土法 soil mixed	3 × 12	5.80% ± 0.0134	11.50% ± 0.0276	15.30% ± 0.0251	17.80% ± 0.0363	19.43% ^a ± 0.0358
成虫 adult	对照 CK	3 × 12	0%	0%	2.80% ± 0.0052	5.60% ± 0.0097	8.33% ^b ± 0.0153
	喷洒法 spraying	3 × 15	0%	0%	0%	2.22% ± 0.0148	2.22% ^a ± 0.0148
	对照 CK	3 × 15	0%	0%	0%	0%	0% ^a

3.2. 布氏白僵菌对大栗鳃金龟幼虫的毒力分析

数据表明, 无论是拌土法还是喷洒法, 布氏白僵菌对 1 龄幼虫(见图 1)均具有较强的致病力, 35 d 后的死亡率都高达 80% 以上, 1~3 龄期的大栗鳃金龟幼虫的死亡率随着虫龄的增加有显著下降, 但整体而言, 白僵菌在低龄幼虫期的毒杀效率较高, 尤其是在 1 龄期, 35 d 的死亡率最高可达到 93.3% ± 0.1745。

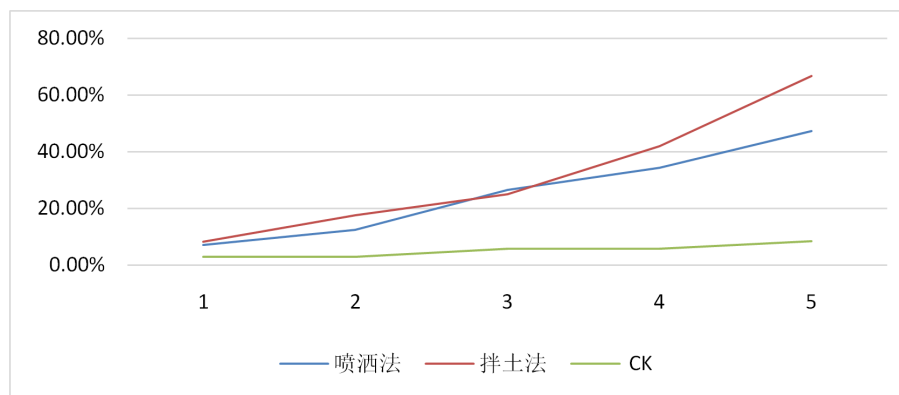


喷洒 $y = 0.22336x - 0.18482$, $R^2 = 0.98285$; 拌土 $y = 0.20276x - 0.14582$, $R^2 = 0.97683$

Figure 1. Fatality rate of 1st larvage stage of *Melolontha hippocastani mongolica*

图 1. 鳃金龟 1 龄幼虫的死亡率

观察期内, 鳃金龟 2 龄幼虫(见图 2)的致死率均在 70% 以下, 喷洒发病率与接种天数间的回归函数拟合度较高, $R^2 = 0.9622$; 而拌土法的拟合度较低, 仅为 0.87842。一定程度上反映了拌土接种的影响因子较多。

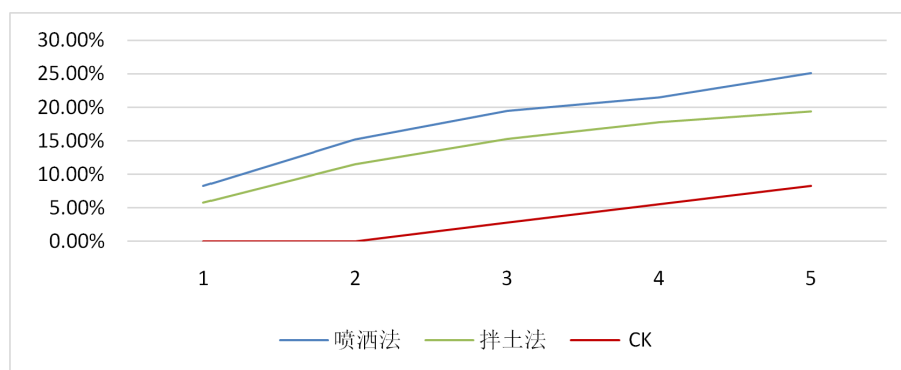


喷洒 $y = 0.08815x$, $R^2 = 0.9622$; 拌土 $y = 0.159x - 0.1932$, $R^2 = 0.87842$

Figure 2. Fatality rate of 2nd larva stage of *Melolontha hippocastani mongolica*

图 2. 鳃金龟 2 龄幼虫的死亡率

相对而言 3 龄幼虫的死亡率较低, 观察期内均在 25.1% 以下(见图 3)。1~2 龄期, 拌土法优于喷洒法, 而 3 龄期则相反, 这可能与幼虫的体壁厚度增加与孢子进入虫体的具体途径有关, 还需进一步加大样本数量, 继续观察, 确定原因。



喷洒 $y = 0.0399x + 0.0595$, $R^2 = 0.9544$; 拌土 $y = 0.03356x + 0.03898$, $R^2 = 0.94566$

Figure 3. Fatality rate of 3rd larva of *Melolontha hippocastani mongolica*

图 3. 鳃金龟 3 龄幼虫的死亡率

3.3. 对大栗鳃金龟成虫的毒力分析

由于大栗鳃金龟成虫体壁非常致密, 孢子不宜进入, 因此只采用了直接喷洒法进行接种, 且孢子密度大幅提升。数据分析结果显示, 差异主要来自组内处理, 直接喷洒法处理的大栗鳃金龟成虫的死亡率最高为 8.3%, 最低 0%, 平均 2.77%, 与对照没有显著性差异, 表明试验周期内布氏白僵菌对大栗鳃金龟成虫无有效致病力。

3.4. 感菌过程观察

通过观察 2 龄幼虫的侵染过程发现, 整体而言, 2~7 d, 体液中的孢子浓度逐渐上升; 28~60 d, 菌丝萌发逐渐覆盖体表。大致可分为以下 5 个阶段(参见图 4): ①孢子经口器进入。孢子经口器进入消化道后, 随血液循环到达血淋巴系统, 接菌后 2 d 即观察到零星的孢子。②孢子出芽产生小孢子。进入血淋巴的孢子出芽产生 1~2 个小孢子, 接菌后 4 d 即观察到孢子萌发及大量新生孢子。③被侵染幼虫少数敏感个体开始死亡。接菌后 6 d 新生孢子越来越多, 弥漫于血淋巴中, 血淋巴开始浑浊, 此时幼虫已开始死亡, 但虫体较软。8~10 d 幼虫开始大量死亡。④孢子产生菌丝并向体表生长。孢子不断产生菌丝, 大量菌丝不断生长, 侵入各组织, 消耗虫体各部组织营养并形成密集的菌丝使虫体僵硬, 体内菌丝长满后开始向表皮生长, 使表皮布满菌丝, 同时消化道及气管中也有菌丝生长。接菌后 12~14 d, 虫体开始变硬。⑤体表产生菌丝、形

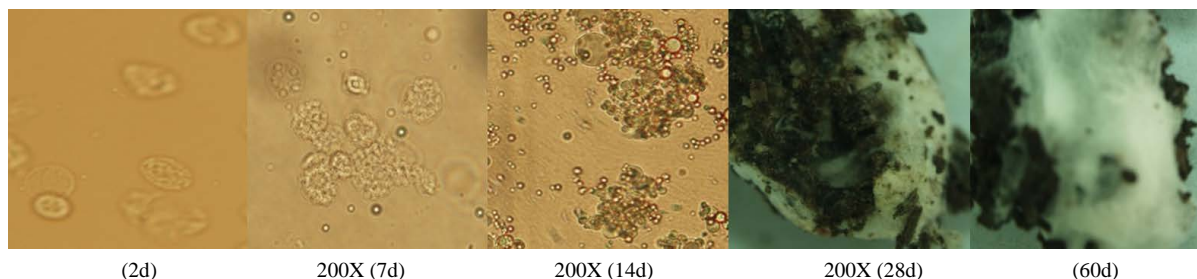


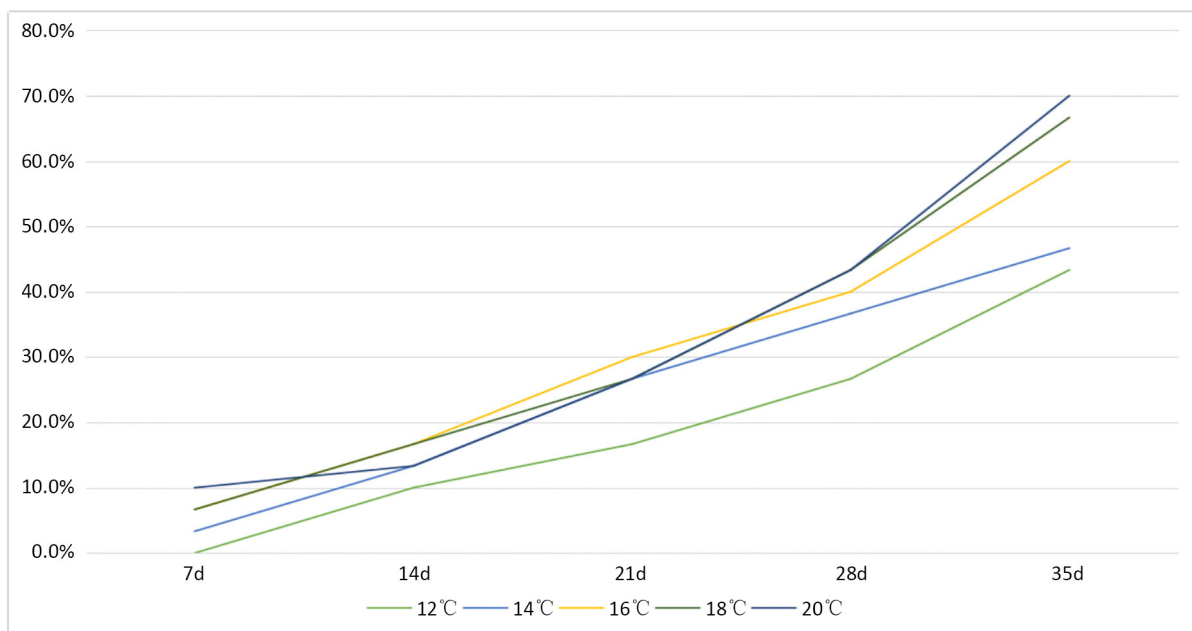
Figure 4. Different infection stages of the *Melolontha hippocastani mongolica*

图 4. 大栗鳃金龟 2 龄幼虫接种后的不同感染阶段

成孢子。菌丝先由气门、口器长出，然后节间生长，最后整个虫体被菌丝包裹呈白色。随着大量孢子，使虫体被满白色或淡黄色的粉状物(分生孢子堆)。接菌后 15 d 虫体表开始出现少量灰白色菌丝，体表出现菌丝后，菌丝生长较快，30 d 后基本将虫体完全覆盖，60 d 后菌丝厚度可达 1 mm 左右。

3.5. 温度对布氏白僵菌毒力的影响

图 5 显示，12℃~18℃区间内，布氏白僵菌对鳃金龟 2 龄幼虫的致死率与温度有着较为严格的线性关系，各个回归曲线的决定系数均在 0.9 以上，温度越高其侵染致死率也就越高。28d 时，是一个明显的分界点，此时间点以后各温度下的幼虫死亡率差异迅速拉大。



Note: 12°C: $y = 0.10333x - 0.11667$, $R^2 = 0.97267$; 14°C: $y = 0.11x - 0.07667$, $R^2 = 0.99725$; 16°C: $y = 0.13x - 0.08333$, $R^2 = 0.98256$; 18°C: $y = 0.14667x - 0.12$, $R^2 = 0.96223$; 20°C: $y = 0.15x - 0.12333$, $R^2 = 0.9255$

Figure 5. Fatality rate of the *Melolontha hippocastani mongolica* at different temperatures

图 5. 不同温度下白僵菌对大栗晒金龟的致死效率

4. 结果与讨论

实验结果表明：布氏白僵菌对大栗鳃金龟 2 龄及以下幼虫有较好的毒杀能力，因此此类害虫的最佳防治期在其低龄幼虫期，此时进行防治可取得较好效果。

布氏白僵菌的侵染过程与前人观察的真菌感染天牛幼虫[1] [2]和蛴螬[3] [4] [5]、地老虎[6]有一定差异，从感病机理上讲，真菌侵染的机制应当是一致的，这可能与本试验用的白僵菌的培养方法、菌种差异以及环境特异性有关，此种白僵菌在培养各阶段观察到也是直接产生孢子而不通过生长菌丝阶段。

白僵菌作为应用较广的一类森防制剂已有不少报道[7] [8]，目前已报道的白僵菌可防治的害虫包括萧氏松茎象[9]、番茄烟粉虱和韭蛆[10]、桑天牛[11]、甜菜夜蛾[12]、沙棘木蠹蛾[13]和靖远松叶蜂[14]等。

由于本次试验用的布氏白僵菌为二级培养菌，从毒力测试的结果看，对大栗鳃金龟 2 龄及以下幼虫有较强的毒力，对大栗鳃金龟 3 龄末期幼虫毒力较弱，对大栗鳃金龟成虫基本不具有毒力。初步分析原因，大栗鳃金龟成虫鞘翅完全形成，体壁硬化彻底，结构致密而厚实，孢子侵入难度加大。结合试验推断，理论上而言，孢子对更加脆弱的初孵幼虫的致死率应当更高。由于在野外的卵期长达 60 d 以上，搜

集足够的初孵化的幼虫有一定难度,因此未能进行初孵幼虫的致死率测试。此外,进一步明确该孢子在野外的存活能力研究有助于后期的用药指导。

大栗鳃金龟幼虫 2 龄~3 龄初期取食量较大,3 龄末期则取食量急剧下降,孢子无法从口腔进入,减少了孢子侵入的机会。同时体壁较厚,孢子也很难从体壁进入,故 3 龄末期感染率降低。反之,2 龄幼虫食量正开始上升,孢子更容易从口腔进入体内,更容易感染成功。在生产上可抓住这一有利时机,在 2~3 龄期及时防治。大栗鳃金龟成虫毒力试验阶段,仅观察到一头成虫的触角部位长出菌丝,但其活动能力仍然很强。要找到白僵菌对成虫的有效防治方法,还需进行更多研究。

有报道指出,虽然白僵菌在室内接种效果较好,但其孢子的侵染力会随着温度、湿度等因素的变化而不同,并且变化幅度非常大,这和本实验的结果比较一致,试验涉及到的温度分布在 12~20 摄氏度,已经看出其致死效率已经有明显差异。因此在防治手段上,可以参考刘洪剑[15]等人的方法,利用体表携带有白僵菌孢子的寄生性天敌来防治目标害虫,利用其双重功效来提高防治效果。

参考文献

- [1] 刘洪剑,朴春根,汪来发,申相澈,郑荣镇,束庆龙. 白僵菌和肿腿蜂对松墨天牛幼虫的作用[J]. 林业科学, 2007, 43(5): 64-68.
- [2] 胡中成,杨毅,马良进,等. 川硬皮肿腿蜂携带白僵菌主动传染松墨天牛探索试验[J]. 浙江林业科技, 2007, 27(3): 48-50.
- [3] 林华峰,王萍莉,张磊,等. 布氏白僵菌和金龟子绿僵菌两变种的生长性状及其对蛴螬的毒力测定[J]. 中国生物防治, 2006, 22(2): 123-127.
- [4] 于有志,孙洪儒. 白僵菌(*Beauveria bassiana*)的致病性及其在地下害虫防治中的应用[J]. 宁夏农学院学报, 2003, 24(1): 58-61.
- [5] 周嘉熹,唐明,万群. 球孢白僵菌对黄斑星天牛幼虫侵染研究[J]. 西北林学院学报, 1991, 6(2): 39-43.
- [6] 杨建全,李芳,陈家骅. 苏云金杆菌对小地老虎的毒力测定[J]. 福建农业大学学报, 2000, 29(1): 65-68.
- [7] 查玉平,陈京元,夏剑萍. 白僵菌防治森林害虫的研究与应用[J]. 湖北林业科技, 2010(3): 40-42.
- [8] 农向群. 布氏白僵菌的研究与应用[J]. 植物保护学报, 2000, 27(1): 83-88.
- [9] 胡志华,胡绍平,温小遂,王辉. 无纺布白僵菌条防治萧氏松茎象试验[J]. 江西植保, 2011, 34(4): 158-159.
- [10] 崔元英. 400 亿孢子/g 球孢白僵菌 WP 对番茄烟粉虱和韭蛆的防治效果研究[J]. 农业灾害研究, 2012, 2(1): 18-20.
- [11] 王晓红,黄大庄,杨忠岐,李会平,郑建伟. 白僵菌感染桑天牛幼虫致病过程的显微观察[J]. 蚕业科学, 2009, 35(2): 376-378.
- [12] 顾丽端,李春香,张淑红. 球孢白僵菌和布氏白僵菌对甜菜夜蛾的室内毒力测定[J]. 江苏农业科学, 2009(3): 118-120.
- [13] 王祥,许志春,刘红霞. 白僵菌对沙棘木蠹蛾幼虫的致病力研究[J]. 国际沙棘研究与开发, 2006, 4(1): 30-33.
- [14] 范丽华,谢映平,原贵生,牛宇. 应用白僵菌防治靖远松叶蜂的研究[J]. 中国森林病虫, 2005, 24(4): 29-32.
- [15] 刘洪剑,朴春根,汪来发. 白僵菌和肿腿蜂对松墨天牛幼虫的作用[J]. 林业科学, 2007, 43(5): 64-68.