

两株棒束孢菌的鉴定及其对茶卷叶蛾和 茶小卷叶蛾的致病力

王定锋^{1,2} 杨 广² 王庆森¹ 曾明森¹ 吴光远^{1*}

(1. 福建省农业科学院茶叶研究所, 福安 355015; 2. 福建农林大学, 农业部闽台作物有害生物
综合治理重点实验室, 福州 350002)

摘要: 为明确分离自茶卷叶蛾和中华大刀螳僵虫的2株虫生真菌的归属及生防潜力, 采用形态学特征和rDNA-ITS序列分析其分类地位, 测定了其对茶卷叶蛾和茶小卷叶蛾幼虫的致病力, 并初步筛选了其最适培养条件。结果表明: 2株真菌均为环链棒束孢 *Isaria cateniannulata*, 分别命名为ICBS918和ICTL911。在 1.0×10^8 孢子/mL浓度下, ICBS918和ICTL911对茶卷叶蛾幼虫的累计校正死亡率均达100%, LT_{50} 分别为3.13 d和3.15 d; 对茶小卷叶蛾幼虫的累计校正死亡率分别为100%和95%, LT_{50} 分别为3.25 d和3.31 d。接菌后8 d, 2菌株对茶卷叶蛾幼虫的 LC_{50} 分别为 0.47×10^5 孢子/mL和 1.01×10^5 孢子/mL; 对茶小卷叶蛾幼虫的 LC_{50} 分别为 2.20×10^5 孢子/mL和 1.34×10^5 孢子/mL。2菌株23℃下最适生长培养基均为综合马铃薯培养基, 最适产孢培养基均为蛋白胨马铃薯葡萄糖琼脂培养基; 在萨氏培养基上, 菌株ICBS918和ICTL911分别在24~30℃及24℃时生长速度最快, 在27℃和21℃时产孢量最大。表明2株环链棒束孢对茶卷叶蛾和茶小卷叶蛾幼虫均具有较好的生防潜力, 可作为生防菌进行开发和应用。

关键词: 环链棒束孢; 茶卷叶蛾; 茶小卷叶蛾; 致病力; 培养特性

Identification of two *Isaria* isolates and bioassay of their pathogenicity against tea tortrix *Homona coffearia* and smaller tea tortrix *Adoxophyes honmai*

Wang Dingfeng^{1,2} Yang Guang² Wang Qingsen¹ Zeng Mingsen¹ Wu Guangyuan^{1*}

(1. Tea Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fu'an 355015, Fujian Province, China;

2. Key Laboratory of Integrated Pest Management for Fujian-Taiwan Crops, Ministry of Agriculture;

Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian Province, China)

Abstract: In order to confirm the taxonomic status and biocontrol potential of two isolates of entomopathogenic fungi, which were isolated from natural cadavers of *Homona coffearia* and *Tenodera sinensis*, morphological characters and molecular analysis of ITS-rDNA were carried out to identify their taxonomic position, the pathogenicity of the two isolates against the larvae of tea tortrix *H. coffearia* and smaller tea tortrix *Adoxophyes honmai* were measured by indoor bioassay, and the optimum culture conditions for the two isolates were preliminarily screened. The results showed that the two isolates were both identified as *Isaria cateniannulata* and named as ICBS918 and ICTL911, respectively. When *H. coffearia* were dealt with ICBS918 and ICTL911 suspension (1.0×10^8 spore/mL), the corrected

基金项目: 国家茶叶产业技术体系(CARS-23), 农业部闽台作物有害生物综合治理重点实验室开放研究基金, 福建省农业科学院茶叶研究所重点项目(2014-cys-02)

作者简介: 王定锋, 男, 1981年生, 助理研究员, 研究方向为害虫生物防治和杀虫微生物分子生物学, E-mail: wangdf2013@yahoo.com

* 通讯作者(Author for correspondence), E-mail: gywupt@163.com

收稿日期: 2014-01-20

accumulative mortalities were both 100% ; LT_{50} values were 3.13 d and 3.15 d, respectively. When *A. honmai* were treated under the same conditions, the corrected accumulative mortalities were 100% and 95% , respectively; LT_{50} values were 3.25 d and 3.31 d, respectively. When *H. coffearia* were dealt with ICBS918 and ICTL911, the LC_{50} values (on the 8th day) were 0.47×10^5 spores/mL and 1.01×10^5 spores/mL, respectively. When *A. honmai* were treated under the same conditions, the LC_{50} values were 2.20×10^5 spores/mL and 1.34×10^5 spores/mL, respectively. The optimal culture media (23 °C) for mycelial growth of the two isolates was CPDA, and for sporulation PPDA. When ICBS918 and ICTL911 were cultured on SDAY medium, the optimal culture temperatures for mycelial growth were 24 – 30 °C and 24 °C , and for sporulation 27 °C and 21 °C , respectively. In conclusion, the two *I. cateniannulata* isolates have great potential for biocontrol of the larvae of *H. coffearia* and *A. honmai*.

Key words: *Isaria cateniannulata*; *Homona coffearia*; *Adoxophyes honmai*; pathogenicity; culture characteristics

茶卷叶蛾 *Homona coffearia* Nietner 和茶小卷叶蛾 *Adoxophyes honmai* Yasuda 是茶树 *Camellia sinensis* 上 2 种重要的卷叶蛾科害虫,主要分布于我国长江流域以南各茶区,国外分布于日本、印度和斯里兰卡等主要产茶国。在茶园中这 2 种害虫经常混杂发生为害,严重影响茶树的生长和茶叶产量;一般年份发生 4 ~ 9 代不等,主要以幼虫卷缀嫩叶匿居咀嚼叶肉,留下表皮形成透明枯斑,且食量随虫龄增大而增大,并不断蚕食成叶、老叶,卷叶数常多达 3 ~ 4 叶,乃至整个芽梢,严重时状如火烧。除茶树外,还为害油茶 *Camellia oleifera*、柑橘 *Citrus reticulata* 和苹果 *Malus pumila* 等多种经济作物^[1-3]。茶卷叶蛾曾导致斯里兰卡茶叶年产量减产超过 50%^[4];丁建华和郭剑雄^[5]报道,该虫导致福州红旗茶场茶树幼苗株受害率达 36%。目前防治茶卷叶蛾科害虫主要采用化学农药结合农业、物理和生物防治^[2-3],而化学农药的大量使用容易导致农药残留、害虫抗药性和次要害虫再猖獗等农业“3R”问题的产生,不仅危害人类健康,而且容易使茶叶出口遭受国际贸易中绿色技术壁垒的冲击而受阻^[6]。为此,寻求高效、安全的防治手段是维护茶产业健康可持续发展的关键。虫生真菌作为农林害虫生物防治的一个重要组成部分,具有易于培养、能持续控制害虫和环境友好等优点,今后将在无公害茶园和有机茶园的害虫防治上发挥越来越重要的作用。

环链棒束孢 *Isaria cateniannulata* 原名环链拟青霉 *Paecilomyces cateniannulatus*,是一种具有很强生防潜力的虫生真菌^[7]。早在上世纪 80 年代初,梁宗琦^[8]就从茶卷叶蛾蛹茧和一种鞘翅目昆虫上分离到该菌,并证实其可感染菜青虫 *Pieris rapae*、茶毛虫

Euproctis pseudoconspersa 和褐飞虱 *Nilaparvata lugens*。之后国内外研究表明,环链棒束孢对蚜虫 *Myzus persicae*^[9]、线虫 *Panagrellus redivivus*^[9-10]、小菜蛾 *Plutella xylostella*^[11-12]、菜青虫^[13-14]、柳杉雷瘿蚊 *Resseliella odai*^[15] 和日本柳杉叶小卷蛾 *Epinotia granitalis*^[16] 等多种农林害虫均具有较好的杀虫活性;姚丽娟^[17]还证实环链拟青霉的代谢产物对小菜蛾和菜青虫的杀虫效果分别为 93.1% 和 38.3%;陈名君等^[18]则发现该菌是天然阔叶次生林和马尾松人工纯林生态系统中虫生真菌的优势种之一;王品等^[19]发现环链棒束孢是广东茶园土壤中一种常见的虫生真菌,一年四季均能检测到。尽管已对环链棒束孢进行了大量的研究,但到目前还未见利用其来防治茶卷叶蛾和茶小卷叶蛾的报道。

为此,本研究在鉴定出分离自茶卷叶蛾幼虫僵虫和中华大刀螳 *Tenodera sinensis* 僵虫的 2 株虫生真菌为环链棒束孢的基础上,测定了其茶卷叶蛾和茶小卷叶蛾幼虫的致病力,并初步筛选了其最适培养条件,旨在为利用环链棒束孢防治茶园 2 种卷叶蛾科害虫提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:菌株 ICBS918 和 ICTL911 分别分离自自然罹病死亡的茶卷叶蛾幼虫僵虫和中华大刀螳僵虫,并用萨氏培养基试管斜面保存于 4 °C 冰箱中。

供试虫源:从茶园中采回茶卷叶蛾和茶小卷叶蛾高龄幼虫,置于扦插在养虫笼内的茶枝中饲养直到化蛹、羽化、产卵。收集卵块置于养虫罩内,卵孵化后,用茶稍喂养,挑选健康的、大小基本一致的 3

龄幼虫用于室内毒力测定。

培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂 (potato dextrose agar, PDA) 培养基: 马铃薯 200 g 煮沸过滤液、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g, 加热溶解后补水至 1 000 mL。蛋白胨马铃薯葡萄糖琼脂 (potato dextrose agar plus 1% peptone, PPDA) 培养基: 在 PDA 培养基中添加 1% 蛋白胨。萨氏培养基 (Sabouraud dextrose agar plus 1% yeast extract, SDAY): 蛋白胨 10 g、葡萄糖 40 g、酵母 10 g、琼脂 20 g, 补充蒸馏水至 1 000 mL。察氏培养基 (Czapek's medium, Czapek): NaNO_3 3 g、 K_2HPO_4 1 g、 KCl 0.5 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g、蔗糖 30 g、琼脂 15 g、蒸馏水 1 000 mL。综合马铃薯培养基 (comprehensive potato medium, CPDA): 20% 马铃薯煮汁 1 000 mL、 KH_2PO_4 3 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g、葡萄糖 20 g、Vitamin B1 8 mg、琼脂 20 g, 加热溶解后补水至 1 000 mL。以上培养基的 pH 值均控制在 7.0, 高压灭菌锅 121 °C 灭菌 15 min。

试剂: 葡萄糖、蔗糖、蛋白胨、酵母浸出汁、琼脂粉、 NaNO_3 、 K_2HPO_4 、 KCl 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、Vitamin B1、吐温-80 均为国产分析纯; 10 × PCR Buffer (Mg^{2+} Plus)、dNTP、*Taq* 酶和 DL2000 DNA marker, 宝生物工程 (大连) 有限公司。

仪器: Eppendorf 5331 PCR 仪, 德国 Eppendorf 公司; Axio Scope A1 生物显微镜, 德国卡尔蔡司公司; JD-801 凝胶成像仪, 江苏省捷达科技发展有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株的形态学观察及鉴定

将供试菌株接种到 Czapek 平板上, 25 °C 培养 14 d, 观察菌株培养性状、产孢结构、孢子形态大小和分生孢子梗等分类特征。参照 Shimazu^[15] 的形态描述和梁宗琦^[20] 的检索表进行菌株的初步鉴定。

1.2.2 菌株 rDNA-ITS 序列的扩增与分析

总 DNA 的提取: 将 2 个菌株分别接入 SDAY 平板中培养 10 d, 从培养皿中刮取菌体用于真菌基因组 DNA 的提取, 具体参照方卫国等^[21] 方法。

rDNA-ITS 序列的 PCR 扩增与测定: ITS 序列 PCR 扩增选用的通用引物为 ITS1 (5'-TCCGTAGGT-GAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')^[22]。PCR 反应体系 25 μL: 10 × PCR 缓冲液 Buffer (Mg^{2+} Plus) 2.5 μL、2.5 mmol/L dNTP 2 μL、30 ng 模板 DNA 1 μL、10 μmol/L 引物 ITS1 和

ITS4 各 1 μL、5 U/μL *Taq* 酶 0.3 μL, 用 ddH₂O 补足至 25 μL。PCR 反应参数设置: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物以 1.5% 琼脂糖凝胶 (带有溴化乙锭) 进行检测。PCR 产物经琼脂糖凝胶回收试剂盒回收纯化后送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。

rDNA-ITS 序列分析: 将 rDNA-ITS 序列测序结果在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对并申请 GenBank 登录号。为明确菌株 ICBS918 和 ICTL911 与同属其它种的亲缘关系, 选择 GenBank 中棒束孢属已公布的具有代表性的几种菌株 DNA 序列, 并以链格孢 *Alternaria alternata* 为外群, 用 Mega 4.0 软件 Clustal X 方法进行多序列比对, 以邻接法 (neighbor joining method) 构建分子系统发育树, 在分枝上标记 1 000 次重复获得的自展检验 Bootstrap 值进行检验^[23]。Bootstrap 值大于 70% 就相当于统计学概率的 95%, 一般 75% 以上认为是可信的^[24]。

1.2.3 菌株对茶卷叶蛾和茶小卷叶蛾的毒力测定

从 SDAY 平板上培养 14 d 的 ICBS918 和 ICTL911 菌株中分别收集其分生孢子, 用含 0.05% 吐温-80 的无菌水溶液分别配置成 1.0×10^8 、 2.0×10^7 、 4.0×10^6 、 8.0×10^5 、 1.6×10^5 孢子/mL 的悬浮液。用浸虫法^[26] 将上述孢子悬浮液分别接种于茶卷叶蛾和茶小卷叶蛾 3 龄幼虫上, 以 0.05% 吐温-80 溶液作为对照, 每处理 10 头幼虫, 重复 4 次。接种后, 具体的培养条件参照王定锋等^[25] 方法。试虫用无农药污染的新鲜茶梢饲养于干净烧杯内, 烧杯口用保鲜膜封住, 并在膜上扎 2 个通气孔, 置于 25 °C、RH ≥ 90%、12 L: 12 D 培养箱中培养, 每 3 天换 1 次新鲜茶梢。从第 2 天开始每天记录幼虫的感染和死亡情况, 并对死亡虫体进行保温保湿培养 (25 °C、RH ≥ 90%), 观察其是否变为僵虫, 连续观察 10 d。计算累计死亡率、校正死亡率和僵虫率。累计死亡率 = 死亡虫口数/处理总虫数 × 100%; 累计校正死亡率 = (处理组累计死亡率 - 对照组累计死亡率)/(1 - 对照组累计死亡率) × 100%; 僵虫率 = 死亡后形成僵虫的虫数/处理总虫数 × 100%。

1.2.4 最适培养基和最适培养温度的筛选

培养基对菌株生长速度和产孢量的影响: 用直径为 6 mm 的打孔器, 将在 SDAY 平板上暗培养 7 d 的 ICBS918 和 ICTL911 菌株的菌落中心到边缘之间打出菌块, 分别接种于 PDA、PPDA、CPDA、SDAY 和

Czapek 平板中央,每个菌株及培养基处理重复 4 次,于 23℃、14 L:10 D 下培养 15 d 后,采用直尺十字交叉法测量菌落直径;并用直径 6 mm 的打孔器从菌落中心至边缘距离的 1/2 处打取菌块,置于 0.05% 吐温-80 溶液中充分震荡,血球计数板计数,统计产孢量,确定菌株的最适培养基。

温度对菌株生长速度和产孢量的影响:用直径 6 mm 的打孔器打取菌块,接种到 SDAY 平板中央,分别置于 15、18、21、24、27、30 和 33℃ 条件下,14 L:10 D 培养,每处理 4 次重复。测量培养 15 d 的菌落直径和产孢量,方法同上,以确定菌株的最适培养温度。

1.3 数据分析

采用 SPSS 17.0 和 Excel 2007 软件进行数据分析,利用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验,Probit 方法计算半数致死浓度 LC_{50} 值、半数致死

时间 LT_{50} 值及相应的回归方程。

2 结果与分析

2.1 菌株的形态学描述及分子生物学鉴定

2.1.1 形态学鉴定

菌株 ICBS918 和 ICTL911 在察氏培养基上培养 14 d,菌落直径均约为 60 mm,菌落正面均为白色,隆起,棉絮状,延长培养产生浓密的孢梗束,菌落背面均为淡黄色。2 菌株菌丝均分隔,透明,光滑,宽 0.5~1.5 μm ;分生孢子梗短,长约 13~24 μm ;其上通常着生 2~4 个瓶梗,瓶梗多数基部球形膨大,于全长 1/2 处向上突然变细,(4.5~10) μm × (1.5~3) μm ;分生孢子透明,光滑,大部分为椭圆形或近球形,(2~4.5) μm × (1.5~2) μm ,常形成叠瓦状排列的斜链或成环状(图 1),初步鉴定 2 菌株均为环链棒束孢 *I. cateniannulata*。

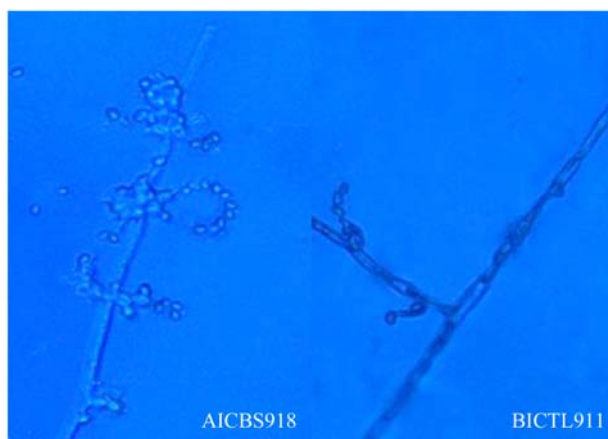


图 1 两个菌株的产孢结构和分生孢子的显微观察(400 ×)

Fig. 1 Conidiogenous structure and conidia of the two isolates under the microscope (400 ×)

2.1.2 菌株 rDNA-ITS 序列分子鉴定

以 ITS1 和 ITS4 为引物,从菌株 ICBS918 和 ICTL911 基因组 DNA 中分别扩增出 1 条约 600 bp 的序列(图 2),PCR 产物测序结果表明,菌株 ICBS918 序列长度为 585 bp,GenBank 登录号为 KC413974;菌株 ICTL911 序列长度为 590 bp,GenBank 登录号为 KC413975。通过 BLAST 与 GenBank 中已有的核酸序列进行比对,发现菌株 ICBS918 和 ICTL911 的 rDNA-ITS 序列和环链棒束孢 *I. cateniannulata* 或环链拟青霉 *P. cateniannulatus* 相应序列的同源性高达 98% 以上。

2.1.3 rDNA-ITS 序列的系统发育分析

菌株 ICBS918 和 ICTL911 与其它环链棒束孢 *I. cateniannulata* 或环链拟青霉 *P. cateniannulatus* 聚集

在一个进化支上,Bootstrap 值为 80% (图 3)。其中菌株 ICBS918、*P. cateniannulatus* SL27 和 *P. cateniannulatus* zy. 7 聚类在一个小的分支上,Bootstrap 值为 86%;而菌株 ICTL911、*I. cateniannulata* 6242 和 *I. cateniannulata* 6240 聚类在另一个小分支上,Bootstrap 值为 100%。综合菌株的培养和形态学特征以及分子鉴定结果,确定菌株 ICBS918 和 ICTL911 均为环链棒束孢。

2.2 菌株对茶卷叶蛾和茶小卷叶蛾幼虫的致病力

茶卷叶蛾和茶小卷叶蛾幼虫在分别接种 1.0×10^8 孢子/mL 菌株 ICBS918 和 ICTL911 孢子悬浮液 2~3 d 后,均出现行动变得迟缓,体表颜色由淡绿色逐渐变为红褐色,部分节间处呈黑色的症状。再经过 1~2 d,死虫体表变软,有部分虫体体表开始

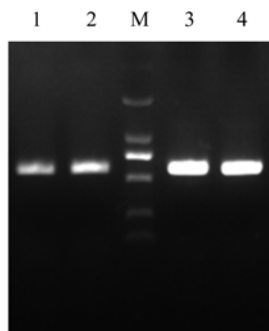


图2 PCR 扩增菌株 ICBS918 和 ICTL911 的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of PCR product amplified from ITS region of ICBS918 and ICTL911 isolates

1~2: 菌株 ICBS918 的 ITS 片段; M: DNA 分子量标准; 3~4: 菌株 ICTL911 的 ITS 片段。1-2: ITS fragment of ICBS918; M: DNA marker (DL2000 bp); 3-4: ITS fragment of ICTL911.

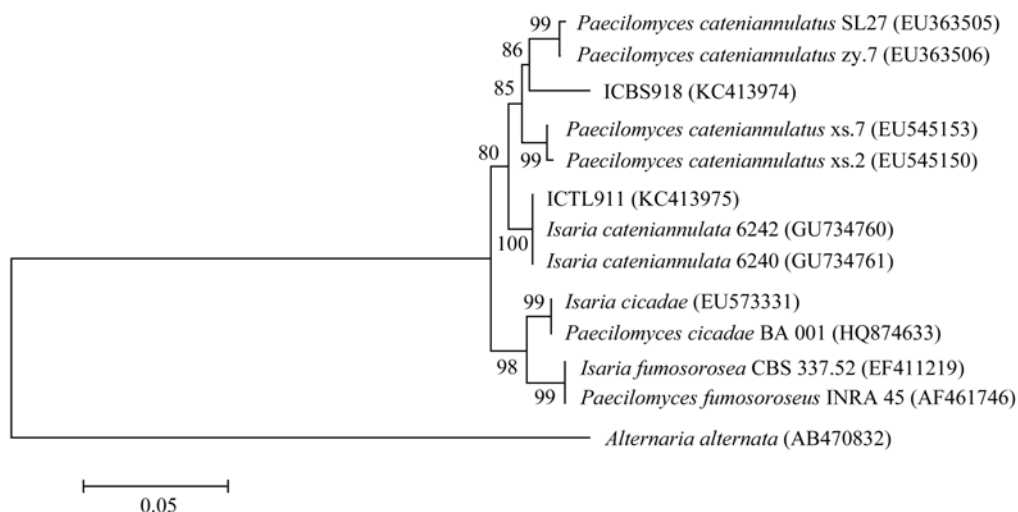


图3 基于 rDNA-ITS 序列的菌株 ICBS918 和 ICTL911 及相关类群的系统发育树

Fig.3 Neighbour-joining tree based on rDNA-ITS sequences from ICBS918 and ICTL911 isolates and other fungi

长出白色菌丝,并逐渐形成僵虫。室内生测结果表明,2 株菌对茶卷叶蛾和茶小卷叶蛾幼虫都具有较强的毒力,试虫死亡率随孢子浓度的增大和接种时间的推移而增加(表1)。 1.0×10^8 孢子/mL 孢子悬浮液处理 8 d 后,菌株 ICBS918 和 ICTL911 对茶卷叶蛾幼虫的累计校正死亡率均达 100%,僵虫率分别为 85% 和 80%, LT_{50} 分别为 3.13 d 和 3.15 d;对茶小卷叶蛾幼虫的累计校正死亡率分别为 100% 和 95%,僵虫率分别为 82.5% 和 85%, LT_{50} 分别为 3.25 d 和 3.31 d。菌株 ICBS918 和 ICTL911 处理茶卷叶蛾幼虫第 8 天的 LC_{50} 值分别为 0.47×10^5 孢子/mL 和 1.01×10^5 孢子/mL;处理茶小卷叶蛾幼虫的 LC_{50} 值分别为 2.20×10^5 孢子/mL 和 1.34×10^5 孢子/mL。

2.3 最适培养基和最适培养温度的筛选

2.3.1 培养基对菌株生长速度和产孢量的影响

菌株 ICBS918 在 CPDA 培养基上生长速度最快,15 d 菌落直径达 73.5 mm,显著快于其它培养基;但其在 PPDA 和 SDAY 培养基上产孢量最大,培养 15 d 分别为 1.30×10^6 孢子/ mm^2 和 1.21×10^6 孢子/ mm^2 ,二者之间差异不显著,但均显著高于其它培养基(图 4-A)。菌株 ICTL911 在 CPDA 和 Czapek 培养基上生长速度最快,15 d 菌落直径达 63.75 mm 和 62.25 mm,二者之间差异不显著;但该菌株在 PPDA 培养基上产孢量最大,培养 15 d 达 1.10×10^6 孢子/ mm^2 ,且显著高于其它培养基(图 4-B)。表明菌株 ICBS918 和 ICTL911 最适生长培养基均为 CPDA;最适产孢培养基均为 PPDA。

表 1 两株棒束孢菌不同孢子浓度处理对茶卷叶蛾和茶小卷叶蛾 3 龄幼虫的致病力(8 d)
Table 1 Virulence of different concentrations of spores of the two *Isaria* spp. isolates against the 3rd instar larvae of *Homona coffearia* and *Adoxophyes honmai* (8 d)

菌株 Isolate	处理浓度 (孢子/mL) Concentration	茶卷叶蛾幼虫 Larva of <i>Homona coffearia</i>				
		校正累计死亡率 (%)	致病力回归方程	χ^2	LT ₅₀ (d)	累计僵虫率 (%)
		Corrected accumulative mortality	Pathogenicity regression equation		(95% CL)	Accumulative rigid cadaver rate
ICBS918	1.0 × 10 ⁸	100.00 ± 0.00 a	y = 5.50x - 2.73	5.31	3.13 (2.81 ~ 3.42)	85.00 ± 2.89 a
	2.0 × 10 ⁷	100.00 ± 0.00 a	y = 6.21x - 3.43	1.43	3.57 (3.25 ~ 3.85)	80.00 ± 4.08 a
	4.0 × 10 ⁶	94.72 ± 3.06 ab	y = 5.72x - 3.52	1.16	4.13 (3.78 ~ 4.46)	70.00 ± 4.08 b
	8.0 × 10 ⁵	89.72 ± 0.28 b	y = 6.12x - 4.17	3.27	4.80 (4.43 ~ 5.16)	62.50 ± 2.50 b
	1.6 × 10 ⁵	69.17 ± 4.17 c	y = 5.27x - 4.18	0.54	6.22 (5.74 ~ 6.84)	47.50 ± 2.50 c
ICTL911	1.0 × 10 ⁸	100.00 ± 0.00 a	y = 6.59x - 3.28	6.98	3.15 (2.86 ~ 3.40)	80.00 ± 4.08 a
	2.0 × 10 ⁷	100.00 ± 0.00 a	y = 7.11x - 3.77	2.28	3.40 (3.11 ~ 3.65)	77.50 ± 2.50 a
	4.0 × 10 ⁶	92.22 ± 2.61 a	y = 5.35x - 3.37	2.39	4.26 (3.90 ~ 4.61)	65.00 ± 2.89 b
	8.0 × 10 ⁵	81.94 ± 2.74 b	y = 5.18x - 3.81	2.30	5.43 (5.01 ~ 5.90)	52.50 ± 2.50 c
	1.6 × 10 ⁵	58.89 ± 4.23 c	y = 4.62x - 3.87	2.37	6.90 (6.27 ~ 7.87)	37.50 ± 4.79 d

菌株 Isolate	处理浓度 (孢子/mL) Concentration	茶小卷叶蛾幼虫 Larva of <i>Adoxophyes honmai</i>				
		校正累计死亡率 (%)	致病力回归方程	χ^2	LT ₅₀ (d)	累计僵虫率 (%)
		Corrected accumulative mortality	Pathogenicity regression equation		(95% CL)	Accumulative rigid cadaver rate
ICBS918	1.0 × 10 ⁸	100.00 ± 0.00 a	y = 5.36x - 2.75	1.64	3.25(2.92 ~ 3.55)	82.50 ± 2.50 a
	2.0 × 10 ⁷	95.00 ± 2.89 a	y = 4.77x - 2.60	0.50	3.52(3.15 ~ 3.85)	75.00 ± 5.00 a
	4.0 × 10 ⁶	84.72 ± 2.74 b	y = 4.99x - 3.50	4.39	5.01(4.60 ~ 5.44)	60.00 ± 4.08 b
	8.0 × 10 ⁵	69.17 ± 4.17 c	y = 4.79x - 3.87	1.60	6.43(5.89 ~ 7.19)	50.00 ± 4.08 b
	1.6 × 10 ⁵	46.11 ± 2.42 d	y = 4.51x - 4.16	2.18	8.38(7.38 ~ 10.60)	37.50 ± 2.50 c
ICTL911	1.0 × 10 ⁸	95.00 ± 2.89 a	y = 4.58x - 2.38	1.15	3.31 (2.96 ~ 3.64)	85.00 ± 2.89 a
	2.0 × 10 ⁷	92.50 ± 2.50 a	y = 5.03x - 2.98	1.11	3.91 (3.57 ~ 4.24)	77.50 ± 2.50 a
	4.0 × 10 ⁶	87.50 ± 2.50 a	y = 6.29x - 4.29	4.55	4.81 (4.47 ~ 5.14)	62.50 ± 2.50 b
	8.0 × 10 ⁵	72.50 ± 2.50 b	y = 5.46x - 4.35	1.01	6.26 (5.80 ~ 6.84)	50.00 ± 4.08 c
	1.6 × 10 ⁵	47.50 ± 2.50 c	y = 4.80x - 4.32	1.73	7.95 (7.13 ~ 9.49)	40.00 ± 4.08 d

表中数据为平均数 ± 标准误。同列数据后不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。 $\chi^2 < \chi^2_{(5, 0.05)} = 11.07$, 故致病力回归方程与实际相符。Data are mean ± SE. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test. $\chi^2 < \chi^2_{(5, 0.05)} = 11.07$, indicating that pathogenicity regression equation conforms to the observed data.

2.3.2 温度对菌株生长速度和产孢量的影响

菌株 ICBS918 在 24、27、30℃ 下生长速度最快, 培养 15 d 菌落直径分别达 67.75、68.75、68.5 mm, 三者之间差异不显著, 但均显著快于其它温度; 该菌株在 27℃ 下产孢量最大, 培养 15 d 达 2.98×10^6 孢子/mm², 显著高于其它温度(图 5-A)。菌株 ICTL911 在 24℃ 下生长速度最快, 培养 15 d 菌落直径

达 61.25 mm, 显著快于其它温度; 其在 21℃ 下产孢量最大, 培养 15 d 达 9.95×10^5 孢子/mm², 显著高于其它温度(图 5-B)。

3 讨论

仅依据形态学分类特征鉴定病原真菌, 对于许多种下差异较小的变种、亚种, 往往难以得到令人满

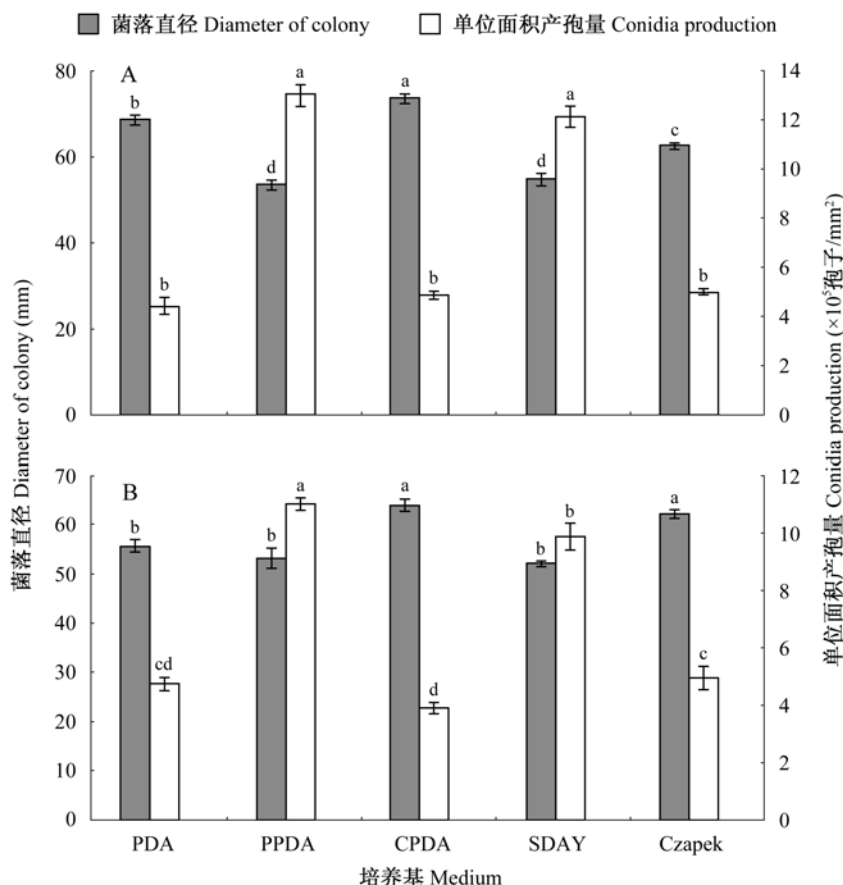


图4 培养基对菌株 ICBS918 (A) 和 ICTL911 (B) 菌落生长及产孢的影响

Fig. 4 Effects of media on colony growth and sporulation of the isolates ICBS918 (A) and ICTL911 (B)

图中数据为平均数 $\pm$ 标准差。柱上不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。PDA、PPDA、CPDA、SDAY、Czapek 分别为马铃薯葡萄糖琼脂、蛋白胨马铃薯葡萄糖琼脂、综合马铃薯、萨氏、察氏培养基。Data in the figure are mean $\pm$ SD. Different lowercase letters on the bars indicate significant difference at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test. PDA: Potato dextrose agar; PPDA: potato dextrose agar plus 1% peptone; CPDA: comprehensive potato medium; SDAY: Sabouraud dextrose agar plus 1% yeast extract; Czapek: Czapek's medium.

意的结果。近年来,飞速发展的分子生物学技术和日益充实的 GenBank 数据库,为病原真菌的分类鉴定提供了强有力的分子依据。rDNA-ITS 序列中不仅有进化缓慢、相对保守的转录区,也有进化速率较快、长度适中的间隔区 (ITS),且拥有用于扩增 rDNA-ITS 不同区域的通用引物^[22],因此被广泛用于病原真菌相似种的鉴定^[26-28]。本试验在形态学鉴定的基础上,通过测定菌株 ICBS918 和 ICTL911 的 rDNA-ITS 序列,并与棒束孢菌其它种的代表菌株的对应序列进行比对分析,从分子水平上进一步确定 2 个菌株均为环链棒束孢。

本试验室内毒力测定的结果表明菌株 ICBS918 和 ICTL911 对 2 种卷叶蛾科害虫具有很强的杀虫活性。 1.0×10^8 孢子/mL 孢子悬浮液处理后,对茶卷叶蛾幼虫的 LT_{50} 值分别为 3.13 d 和 3.15 d,对茶小

卷叶蛾幼虫的 LT_{50} 值分别为 3.25 d 和 3.31 d;且 2 个菌株延长培养都会产生浓密的孢梗束。这与 Han 等^[29]表明环链棒束孢孢梗束的形成可作为高致病性菌株选择的一个重要指标,孢梗束浓密的菌株对小菜蛾致病性强的结果相似。虽然室内毒力测定表明 2 个菌株具有很高的毒力,但如何开发出适用于田间施用的剂型以及配套使用方法来适应复杂、多变的茶园环境,还有待进一步的研究。

培养基组分和培养温度直接影响环链棒束孢的生长速率和产孢量,最适培养基和最适培养温度的初步筛选将为菌株今后规模化生产提供一定的试验依据。朱新燕等^[30]研究表明 CPDA 培养基不仅有利于环链拟青霉菌落生长,而且有利于其产孢。但本研究结果表明,虽然 CPDA 培养基为菌株 ICBS918 和 ICTL911 的最适生长培养基,但 2 菌株的最适产

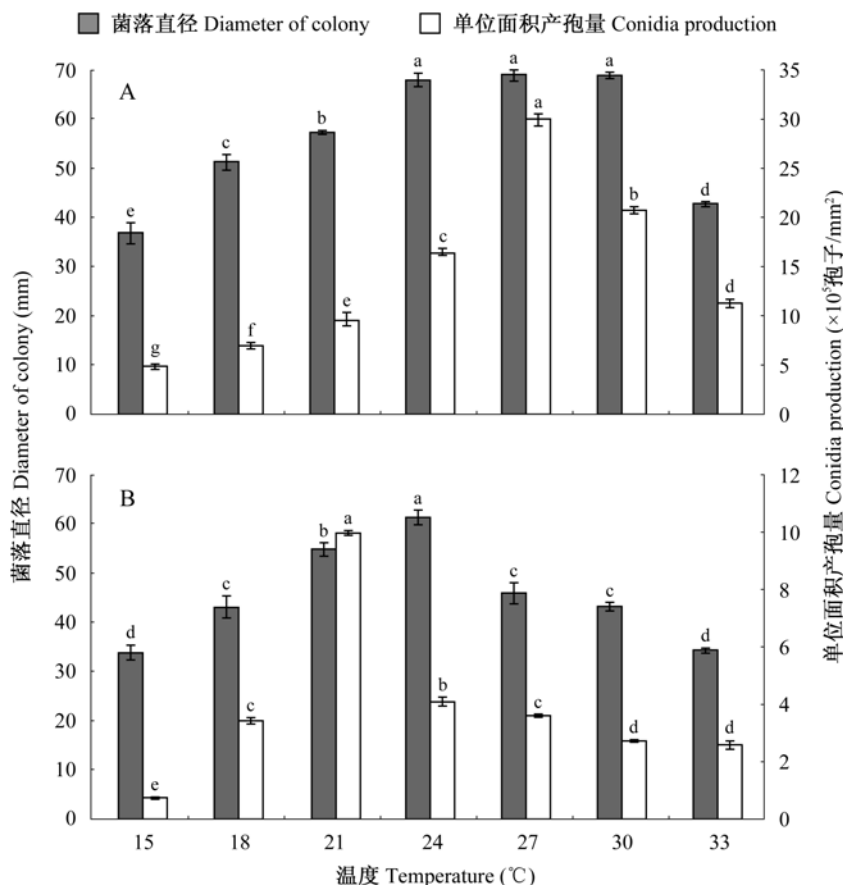


图5 温度对菌株 ICBS918(A) 和 ICTL911(B) 菌落生长及产孢的影响

Fig. 5 Effects of temperature on colony growth and sporulation of the isolates ICBS918 (A) and ICTL911 (B)

图中数据为平均数 $\pm$ 标准差。柱上不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。Data in the figure are mean $\pm$ SD. Different lowercase letters on the bars indicate significant difference at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

孢培养基却为 PPDA 培养基;菌落生长速率较快的培养基,其单位面积产孢量反而较小。菌株 ICTL911 在 21 ~ 24 °C 生长速率逐渐加快直到达到最大值 (24 °C),该结果与朱新燕等^[30]报道的 3 株环链拟青霉 Pc45、Pc287 和 Pc305 在 23 °C 菌落生长速率最快的研究结果较一致。本研究中菌株 ICBS918 在 24 ~ 30 °C 范围生长速率最快;而 Shimazu^[15]对 30 株环链拟青霉菌株的观察发现,在麦芽琼脂培养基 (malt extract agar, MEA) 和 SDAY 培养基上其最适生长温度是 25 °C,最不适合生长的温度是 30 °C。以上几个菌株的最适生长温度都高于林华峰等^[31]报道的环链拟青霉菌丝适宜生长温度为 20 °C,说明环链棒束孢不同菌株之间最适生长温度存在较大差异。温度对环链棒束孢产孢量的影响也同样显著,本研究中菌株 ICBS918 在 27 °C 下产孢量最大,这与朱新燕等^[30]报道的菌株 Pc305 在 27 °C 下产孢最多的结果一致,但该温度高于菌株 Pc45 和 Pc287 最大产孢量温度 23 °C,远高于本研究中菌株 ICTL911 的

最大产孢量温度 21 °C。菌株 ICBS918 的产孢能力远大于 ICTL911,且其生长的最适温度范围与茶卷叶蛾和茶小卷叶蛾发生较严重的夏秋季节气温较接近,具有开发成生防菌剂的巨大潜力。

参考文献 (References)

- [1] 谭济才. 茶树病虫害防治学. 北京: 中国农业出版社, 2002: 99 - 102
- [2] 张汉鹄, 谭济才. 中国茶树害虫及其无公害治理. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2004: 189 - 196
- [3] 陈宗懋. 中国茶叶大辞典. 北京: 中国轻工业出版社, 2000: 176 - 177
- [4] Cranham J E. Tea pests and their control. Annual Review of Entomology, 1966, 11: 491 - 514
- [5] 丁建华, 郭剑雄. 茶卷叶蛾的初步观察. 茶叶科学简报, 1989(1): 20 - 25
- [6] 陈宗懋. 茶叶质量安全和标准建设应与时俱进. 中国茶叶加工, 2012(1): 1
- [7] Luangsa-Ard J J, Hywel-Jones N L, Manoch L, et al. On the relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species. Mycological Research, 2005, 109(5): 581 - 589

- [8] 梁宗琦. 拟青霉属的两个新种. 微生物学报, 1981, 21(1): 31 – 34
- [9] Liang Z Q, Han Y F, Chu H L, et al. Studies on the genus *Paecilomyces* in China. I. Fungal Diversity, 2005, 20: 83 – 101
- [10] 姚婷, 梁宗琦, 莫明和, 等. 拟青霉云南菌株的杀线虫作用. 中国生物防治, 2006, 22(3): 226 – 229
- [11] 韩燕峰, 张延威, 梁建东, 等. 一些拟青霉菌株对小菜蛾致病性的初步研究. 植物保护, 2008, 34(2): 46 – 49
- [12] 何劲, 康冀川, 雷帮星, 等. 四株虫生真菌的鉴定及其对小菜蛾的室内毒力. 植物保护学报, 2010, 37(4): 341 – 346
- [13] 梁宗琦. 茶树害虫的虫生真菌. 植物病理学报, 1981, 11(4): 9 – 16
- [14] 刘爱英, 陈月碧, 梁宗琦, 等. 环链拟青霉和玫烟色拟青霉对菜青虫致病条件的研究. 贵州农业科学, 1982(1): 57 – 58
- [15] Shimazu M. *Paecilomyces catenianulatus* Liang, a commonly found, but an unrecorded entomogenous fungus in Japan. Applied Entomology and Zoology, 2001, 36(3): 283 – 288
- [16] Mitsuhashi W, Shimazu M, Hashimoto H. Control of *Epinotia granitalis* (Lepidoptera: Tortricidae) with *Paecilomyces* spp. on cotton bands wrapped on the trunks of *Cryptomeria japonica*. Applied Entomology and Zoology, 1992, 27(2): 295 – 296
- [17] 姚丽娟. 几株真菌代谢产物的杀虫效果试验简报. 昆虫天敌, 1996, 18(1): 42 – 43
- [18] 陈名君, 黄勃, 李增智. 三种森林生态系统昆虫病原真菌优势种生态位比较. 应用生态学报, 2011, 22(5): 1275 – 1279
- [19] 王品, 黄翠, 黎健龙, 等. 英德市茶园土壤昆虫病原真菌群落结构与多样性研究. 茶叶科学, 2013, 33(6): 562 – 569
- [20] 梁宗琦. 中国真菌志(第43卷): 拟青霉属、棒束孢属、戴氏霉属. 北京: 科学出版社, 2013: 103 – 107
- [21] 方卫国, 杨星勇, 张永军, 等. 真菌核酸的一种快速提取方法. 应用与环境生物学报, 2002, 8(3): 305 – 307
- [22] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. // Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, et al. PCR protocols: a guide to methods and applications. New York: Academic Press, 1990: 315 – 322
- [23] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596 – 1599
- [24] 叶利芹, 吴小芹, 叶建仁. 竹叶锈病重寄生现象及重寄生菌鉴定. 菌物学报, 2011, 30(3): 414 – 420
- [25] 王定锋, 吴光远, 王庆森, 等. 茶卷叶蛾寄生真菌的分离、鉴定及毒力测定. 福建农业学报, 2010, 25(3): 345 – 349
- [26] 彭慧, 郑岳臣. rDNA ITS 序列在鉴定尖端赛多孢子菌中的应用. 同济医科大学学报, 2000, 29(1): 26 – 28
- [27] 朱辉, 覃伟权, 黄山春, 等. 一株红棕象甲寄生真菌的分离鉴定. 植物保护学报, 2010, 37(4): 336 – 340
- [28] 曹君正, 武侠, 林森. 刀孢蜡蚧菌的鉴定及其对南方根结线虫不同生活阶段的定殖. 中国农业科学, 2012, 45(12): 2404 – 2411
- [29] Han Y F, Zhang Y W, Liang J D, et al. Culture characteristics, pathogenicity, and genetic variation of *Isaria catenianulata* isolates. 菌物学报, 2012, 31(3): 341 – 349
- [30] 朱新燕, 李增智, 樊美珍, 等. 3 株环链拟青霉固体培养条件的研究. 安徽农业大学学报, 2008, 35(1): 38 – 41
- [31] 林华峰, 李世广, 徐庆丰. 三种虫生真菌培养性状的研究. 安徽农业大学学报, 1999, 26(4): 440 – 442

(责任编辑:李美娟)