



陈春艳, 谢映平, 周西贝, 等. 三株球孢白僵菌对栗实象甲幼虫的感染和致病力研究 [J]. 环境昆虫学报, 2017, 39 (1): 198–206.

## 三株球孢白僵菌对栗实象甲幼虫的感染和致病力研究

陈春艳, 谢映平\*, 周西贝, 王旭, 王云

(山西大学生命科学学院, 太原 030006)

**摘要:** 为了明确球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 3 菌株 TST05、FDB01、SYN01 对栗实象甲老熟幼虫的感染、致死率、致死中时、以及胞外蛋白酶、几丁质酶、脂肪酶的活性与毒力的关系, 本研究采用 3 个菌株的孢子悬浮液 ( $1.0 \times 10^8$  孢子/mL), 浸虫法感染栗实象甲幼虫, 统计连续 8 d 的校正死亡率; 以栗实象甲幼虫的虫体作为菌株的唯一碳源制备液体培养基, 测定培养过程中各菌株的脂肪酶、几丁质酶、类枯草杆菌蛋白酶 (Pr1 酶) 连续 8 d 的酶活性变化。结果表明, 球孢白僵菌 3 个菌株 TST05、FDB01、SYN01 感染栗实象甲幼虫后, 1–4 d 内表现出染病和死亡的症状, 连续 8 d 累积校正死亡率分别为 40%、44.4%、62.22%, 菌株 SYN01 对栗实象甲的致死率最高, 与其他两菌株的差异显著; 菌株 TST05、FDB01、SYN01 的 Pr1 酶活性最大峰值分别为 ( $175.56 \pm 0.7$ ) U/mL、( $172.74 \pm 2.32$ ) U/mL、( $195.71 \pm 5.41$ ) U/mL。几丁质酶活性最大峰值分别为 ( $12.58 \pm 0.58$ ) U/mL、( $13.06 \pm 1.16$ ) U/mL、( $15.12 \pm 0.32$ ) U/mL。都是菌株 SYN01 的酶活性最大, 而 TST05 和 FDB01 之间差异不显著; 球孢白僵菌 3 个菌株的 Pr1 酶、几丁质酶、脂肪酶在 8 d 内的酶活性平均值与染菌幼虫 8 d 累积校正死亡率的线性回归方程分别为  $y = 0.4641x + 122.45$  ( $R^2 = 0.8854$ )、 $y = 0.034x + 10.473$  ( $R^2 = 0.9328$ )、 $y = 0.0354x + 2.4586$  ( $R^2 = 0.1201$ ), 说明菌株的 Pr1 酶和几丁质酶活性与幼虫死亡率之间呈显著的线性相关, 而菌株的脂肪酶活性与菌株对幼虫的致死率不具有线性关系。综合分析, 菌株 SYN01 可以作为生物防治栗实象甲的病原菌种; Pr1 酶与几丁质酶的活性可作为菌株的毒力因子。

**关键词:** 板栗; 栗实象甲; 球孢白僵菌; 毒力; 胞外酶

中图分类号: Q963; S893.3

文献标志码: A

文章编号: 1674-0858 (2017) 01-0198-09

## Virulence of three strains of *Beauveria bassiana* infected *Curculio davidi* Fairmaire

CHEN Chun-Yan, XIE Ying-Ping\*, ZHOU Xi-Bei, WANG Xu, WANG Yun (College of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

**Abstract:** This research is to explore the infection symptoms, lethality rate, the median lethal time (LT50) of the larvae of *Curculio davidi* infected with the three strains of *Beauveria bassiana* (TST05, FDB01 and SYN01), and to explore the relationship between the activities of extracellular enzymes and virulence of the three strains. The following methods were used. The *C. davidi* were infected by immersing the insects with conidial suspension ( $1.0 \times 10^8$  conidia/mL) of the three strains. The corrected lethality rates of the larvae were recorded every day. The baked dry larvae were used as the sole carbon source in the medium for fungal culturing, and the activities of three extracellular enzymes, including lipase, protease (Pr1) and chitinase produced by the three strains were determined. The

基金项目: 山西省科技攻关项目 (20140311017-6)

作者简介: 陈春艳, 女, 1991 年生, 山西临汾人, 在读研究生, 研究方向为昆虫病原真菌与生物防治, E-mail: 873871578@qq.com

\* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: xieyingping@eyou.com

收稿日期 Received: 2016-07-01; 接受日期 Accepted: 2016-08-22

results showed the diseased symptoms and death of larvae started in 1 – 4 d after inoculation , and the cumulative mortality on 8 d of TST05 , FDB01 and SYN01 were 40% , 44.4% and 62.22% , respectively. In which , the SYN01 strain caused the highest mortality rates of the larvae and showed significant difference compared to the strains TST05 and FDB01. The maximum peak values of Pr1 enzyme activities of the strains TST05 , FDB01 and SYN01 were ( 175.56  $\pm$  0.7 ) U/mL , ( 172.74  $\pm$  2.32 ) U/mL and ( 195.71  $\pm$  5.41 ) U/mL , respectively. The maximum peak values of chitinase activity of the three strains were ( 12.58  $\pm$  0.58 ) U/mL , ( 13.06  $\pm$  1.16 ) U/mL and ( 15.12  $\pm$  0.32 ) U/mL , respectively. The Pr1 activities and chitinase activity of strain SYN01 were the highest in the three strains. And no difference existed between TST05 and FDB01. The relationships between the average values of Pr1 activity , chitinase activity and lipase activity of three strains in the period of 8 d and to the cumulative mortality of the infected larvae were analyzed , and the linear equations were  $y = 0.4641 + 122.45 ( R^2 = 0.8854 )$  ,  $y = 0.034x + 10.473 ( R^2 = 0.9328 )$  ,  $y = 0.0354x + 2.4586 ( R^2 = 0.1201 )$  , respectively. It is indicated a significant linear relationship between Pr1 activity and chitinase activity of the strains and the larval mortality. Based on comprehensive analysis of the results , the strain SYN01 can be considered as a better pathogenic fungus for biological control of *Curculio davidi* larvae. Pr1 and chitinase activity can be used as virulence index for strain choice.

**Key words:** *Castanea mollissima* Blume; *Curculio davidi* Fairmaire; *Beauveria bassiana*; virulence; extracellular enzymes

板栗 *Castanea mollissima* Blume 原产我国,栽培历史悠久,2015 年我国板栗总面积达到 180 万 ha,年产量 195 万 t,占世界板栗总产量的 84%。板栗作为重要的生态经济林树种,分布于全国 26 个省(区、市),在山区脱贫致富和出口贸易中具有重要作用。但是板栗果实受栗实象甲 *Curculio davidi* Fairmaire (属鞘翅目 Coleoptera,象甲科 Curculionidae) 的危害十分严重(魏敏宣和刘瑞江,2014)。栗实象甲在我国主要的板栗种植区均有发生,每年约有 20% – 45% 的板栗果实受害,严重地区可达 80% 以上,造成经济损失巨大(袁少杰等,2010; 李春野和孔凡涛,2012; 黄莉宁,2014)。

栗实象甲在我国大部分地区两年一代。成虫在板栗的嫩叶、新芽、幼果上取食,交配后产卵,卵产于板栗果实内,待幼虫孵化后,在板栗果实内蛀食。蛀食后的板栗果实内部蛀空,充满虫粪,无法食用,失去商品价值(遇文婧等,2015)。由于栗实象甲幼虫钻蛀在果实内危害,防治十分困难。目前,国内外针对栗实象甲为害所采取的防治措施主要包括林业防治、人工防治、化学防治(屈顶柱等,2009; Speranza *et al.* , 2010)。其中林业防治和人工防治的措施具有费时、费力、见效慢等缺点。化学防治的树冠喷药对蛀入果实内的幼虫和入土的老熟幼虫起不到防治效果,在山

区不易操作并造成污染。最近几年,国外试验利用线虫、白僵菌、绿僵菌作为致病因子对栗实象甲进行生物防治,有一定的效果(Kepenecki *et al.* , 2004; Ihara *et al.* , 2009)。我国目前有利利用粉拟青霉菌防治栗实象甲取得一定的效果(孙绍芳等,2004)。

前期在山西省昔阳县的观察发现,栗实象甲幼虫脱果后,隐藏在林冠下土壤内约 20 cm 深的土层中,滞育时间长达 8 个月,才能化蛹,羽化为成虫出土,这为利用昆虫病原真菌作为生物制剂在土壤中进行生物防治提供了可能。因此,本文选择本实验室拥有的球孢白僵菌 3 个菌株 SYN01、TST05、FDB01 作为材料,研究了这 3 个菌株对栗实象甲的毒力,及与菌种的胞外酶(蛋白酶、几丁质酶、脂肪酶)活性的关系,为生物防治提供基础依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 栗实象甲

本研究以山西省晋中市昔阳县洪川村的板栗林为试验园,观察和采集栗实象甲。该地为山区环境,板栗面积 133 ha,主要种植品种为大板红,属于多年生结果大树。连续多年栗实象甲发生严重,果实受害率 40%。根据生物学特性的观察,

在板栗收获前期,于2015年9月下旬在试验园采回板栗虫果300 kg,带回实验室。

在实验室解剖虫果,镜检观察栗实象甲幼虫在果实内的虫口密度和取食情况。统计板栗果实上的虫孔数量、果内幼虫数量、幼虫在果内钻蛀形成的孔和坑道、排泄的虫粪、以及幼虫的体长等几项指标,分析幼虫在果内危害的时间长短和发育进度。并观察栗实象甲幼虫的自然脱果情况,收集脱果的老熟幼虫,置于一定湿度的土中,作为染菌试验的幼虫材料。

## 1.2 菌种

试验用的菌种材料是本实验室保存的3个球孢白僵菌菌株SYN01、TST05、FDB0,其中TST05菌株是本实验室2009年从山西省襄汾县桃小食心虫 *Carposina niponensis* Walsingham 越冬幼虫的自然染病虫体上分离获得,该菌株已保藏于北京中国科学院微生物研究所的中国普通微生物菌种保藏管理中心,保藏号为CGMCC4526。FDB01菌株是本实验室2001年从东北吉林省伊通县红松林帕克阿扁松叶蜂 *Acantholyda parki* 幼虫染病虫体上分离获得。SYN01菌株,购买于中国普通微生物菌种保藏中心,保藏号为CGMCC3.4428,原寄主为松毛虫 *Dendrolimus kikuchii* Matsumura。

孢子悬浮液的制备:用PDA培养基(马铃薯200 g,琼脂粉20 g,葡萄糖20 g,蒸馏水1000 mL)制备平板,接种后置于人工气候箱中(温度 $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 $70\% \pm 10\%$ 、光照周期L:D=14:10)培养8 d,然后将孢子刮于含有0.1% Tween-80的无菌水中,配置成浓度为 $1.0 \times 10^8$ 孢子/mL的孢子悬浮液。孢子浓度用细胞计数板在显微镜下计数。

## 1.3 菌株对栗实象甲幼虫的感染及致死率测定

从收集到的栗实象甲老熟幼虫中挑选出形态大小相似的健康幼虫,进行染菌试验,每组30头,设定3重复。采用浸虫法将幼虫分别在菌株的孢子悬浮液( $1.0 \times 10^8$ 孢子/mL)中浸湿2 s,放于滤纸上,将多余的液体吸干。置于人工气候箱进行培养(温度 $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 $70\% \pm 10\%$ 、光照周期L:D=14:10),每天观察幼虫发病情况,并记录拍照死亡情况,计算校正死亡率和致死中时。

## 1.4 菌株3种胞外酶活性的测定

### 1.4.1 专用培养基的制备

为了考察球孢白僵菌3菌株在感染栗实象幼

虫过程中,菌种分泌蛋白酶、几丁质酶、脂肪酶的活性,试验中制备了以栗实象甲幼虫的虫体作为培养球孢白僵菌唯一碳源的专用培养基。具体方法:将收集到的栗实象甲幼虫反复冲洗后,在 $80^{\circ}\text{C}$ 的烘箱中烘干至恒重,将烘干的虫体研磨成粉末,保存。准确称取0.1 g虫体粉末,加入到30 mL基本培养液中(基本培养液组成:每1000 mL蒸馏水水中含有1.5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.6 g  $\text{MgSO}_4$ , 0.5 g KCL, 1 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ),于高压灭菌锅(LDZX-75KB)中 $121^{\circ}\text{C}$ 灭菌30 min,制备成以栗实象甲虫体作为球孢白僵菌唯一碳源的专用培养基。

### 1.4.2 粗酶液的提取

3菌株分别进行。取3 mL浓度为 $1.0 \times 10^8$ 孢子/mL孢子悬浮液接种到上述液体培养基中,每菌株设3个重复。置于 $25^{\circ}\text{C}$ , 125 r/min低温摇床(MAXQ5000)中培养,每24 h取1 mL的培养液于1.5 mL的EP管,连取8 d, $4^{\circ}\text{C}$  12000 g/min的冷冻离心机中离心20 min(Eppendorf-5804R),取上清液即为粗酶液,准确标号, $-80^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱(DW-HL668)中保存。

### 1.4.3 类枯草杆菌蛋白酶(Pr1酶)活性的测定

参照St Leger等(1987)的方法并略作改动:吸取30  $\mu\text{L}$ 粗酶液,30  $\mu\text{L}$ 底物( $1.5 \times 10^{-3}$  mol/L以Sul-Ala-Ala-pro-phe-PNA为反应底物),30  $\mu\text{L}$  Tris-HCL(0.05 mol/L PH 8.0)分别加入到1.5 mL EP管中,标号,充分混匀。空白对照:将上述底物用30  $\mu\text{L}$ 二甲基亚砷代替。 $28^{\circ}\text{C}$ 水浴锅反应20 min,加入110  $\mu\text{L}$ 预冷的冰乙酸终止反应。吸出200  $\mu\text{L}$ 加入酶标板中,于多功能酶标仪(型号M5)410 nm处测定OD值。以硝基苯胺含量标准曲线计算酶活。每个酶活单位定义为每分钟催化分解(Sul-Ala-Ala-pro-phe-PNA)生成1  $\mu\text{g}$ 硝基苯胺的酶量。

### 1.4.4 几丁质酶活性测定

参照曹广春(2007)的方法略做改动。依次将制备好的0.1 mL胶体几丁质,0.1 mL酶液加入1.5 mL EP管中,标号,充分混匀。 $37^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中加热4 h。用离心机8000 r/min离心5 min,取出上清液,往里加入20  $\mu\text{L}$ 四硼酸钾溶液,充分混匀,沸水浴加热5 min,自来水冷却至室温,加入300  $\mu\text{L}$  10%二甲氨基苯甲醛试剂, $37^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中保温20 min,自来水冷却至室温。依次吸出200  $\mu\text{L}$ 加入酶标板中,于多功能酶标仪585 nm处

测定 OD 值。以 N-乙酰氨基葡萄糖含量标准曲线计算酶活性。每个酶活性单位定义为每分钟催化分解几丁质生成  $1 \mu\text{g}$  N-乙酰氨基葡萄糖的酶量。

#### 1.4.5 脂肪酶活性测定

参照 Silva 等 (2005) 的方法。将制备好的 200  $\mu\text{L}$  的基质液 (由 A 液与 B 液组成, A 液为 10 mL 含有 30 mg 对硝基棕桐酸的异丙醇; B 液为 90 mL 0.05 mol/L Tris-HCL 缓冲液 (PH = 8.0), 含有 100 mg 阿拉伯胶和 207 mg 脱氧胆酸钠) 加入到 1.5 mL EP 管中,  $37^\circ\text{C}$  水浴锅中预热 10 min, 加入 20  $\mu\text{L}$  的酶液, 充分混匀,  $37^\circ\text{C}$  水浴锅中加热 20 min, 加入 300  $\mu\text{L}$  三氯乙酸 (0.05 mol/L), 混匀, 室温反应 5 min 终止反应, 加入 320  $\mu\text{L}$  NaOH (0.05 mol/L); 对照组先加入三氯乙酸再加入酶液。吸取 200  $\mu\text{L}$  反应液加到酶标板中, 410 nm 处测 OD 值。以对硝基苯酚含量标准曲线计算酶活。每个活性单位定义为每分钟催化分解脂肪生成  $1 \mu\text{g}$  硝基苯酚酶量。

#### 1.5 数据统计分析

应用 IBM SPSS Statistics 19.0 软件进行数据分析, 试验结果采用单一变量方差分析 (ANOVA), Duncan 法对不同数据进行多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 栗实象甲在板栗果实内为害的 3 个阶段

2015 年 9 月 20 日将采集的有栗实象甲钻蛀的板栗虫果 (图 1A) 带回实验室, 在室内经过一个月的解剖和观察。结果显示, 山西省晋中市昔阳县洪川村的板栗虫果率达到 40%, 单个果实内象甲幼虫平均数量 6.8 头, 多为 3-5 头, 最多可达 14 头。虫口口径一般以 2.5 mm 为主。栗实象甲在板栗内的虫体大小和为害可划分为 3 个阶段, 即为害初期、中期、末期。为害初期 (图 1B) 的特点是, 幼虫还处于刚孵化后不久, 虫体小, 透明, 可隐约看到, 伴随一些白色粉末状的虫粪颗粒。为害中期 (图 1C), 幼虫发育较大, 体长 8.5-12 mm, 乳白色, 无足, 呈镰刀形弯曲, 头部为黄褐色, 口器黑褐色。一颗板栗果实内有 1 到数头幼虫蛀食的隧道, 隧道分布在果实的表面, 直径约 3 mm, 充满白色虫粪。为害末期 (图 1D), 幼虫发育到老熟阶段, 开始咬破板栗果壳, 陆续脱果入土。此时果肉已经被幼虫取食, 果实内充满颗粒状虫粪, 果壳外表有幼虫钻出时留下的虫孔 (图 1E)。

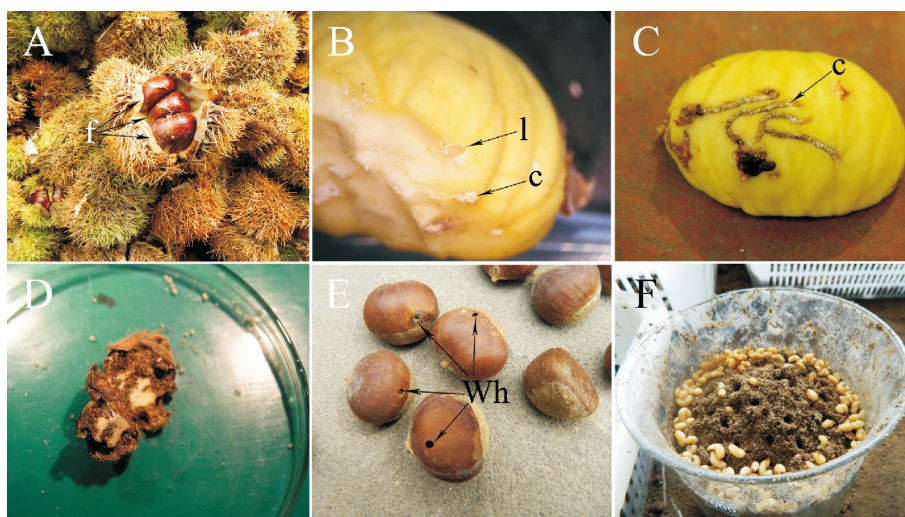


图 1 受害板栗与栗实象甲幼虫

Fig. 1 The infested *Castanea mollissima* and *Curculio davidi* larvae

注: A, 板栗果实; f, 虫果; B, 危害初期; 显示 l, 幼虫; c, 粪道; C, 危害中期; c, 坑道和虫粪; D, 危害末期, 板栗虫果彻底失去价值; E, 老熟幼虫钻出果实后留下的虫孔; wh, 虫孔; F, 收集到的老熟幼虫。Note: A, *C. mollissima* fruit; f, the fruit infested by the *Curculio davidi*; B, the fruit in the early damage; l, larva; c, coprodaeum; C, fruit damaged in the medium term; showing c, coprodaeum; D, the damaged fruit without value; E, damaged fruit with holes caused by the *C. davidi* emerge; wh, wormhole; F, the mature larvae.



在9月20日刚采集回来的板栗虫果中, 栗实象甲的幼虫和为害大部分还处于初期阶段, 少数处于中期和后期, 经过5 d时间, 处于为害初期的幼虫比例占60%–70%, 处于中期的幼虫占20%–30%, 有个别的幼虫老熟, 开始脱果。25 d后, 约80%–85%幼虫发育为第3阶段, 出现大量老熟幼虫脱果, 还有约10%–15%的幼虫处于为害中期。大约一个月时间, 绝大部分幼虫完成脱果和入土, 此时收集老熟幼虫(图1F), 进行后续染菌试验。

## 2.2 染菌后栗实象甲幼虫的外观症状

用3个菌株TST05、SYN01、FDB01(孢子悬浮液浓度:  $1 \times 10^8$  孢子/mL)对栗实象甲老熟幼虫进行染菌试验, 连续观察幼虫的感染症状。结果显示, 从第2天开始, 染菌幼虫体表光泽度减弱, 活动力下降, 虫体表面相继出现不同程度的褐色斑块(如图2B、2F、2J); 从第3天开始, 虫体颜色加深, 个别幼虫开始死亡(如图2C、2G、2K); 从第4天开始, 幼虫相继死亡, 虫体表面也相继被覆白色的菌丝(如图2D、2H、2L)。

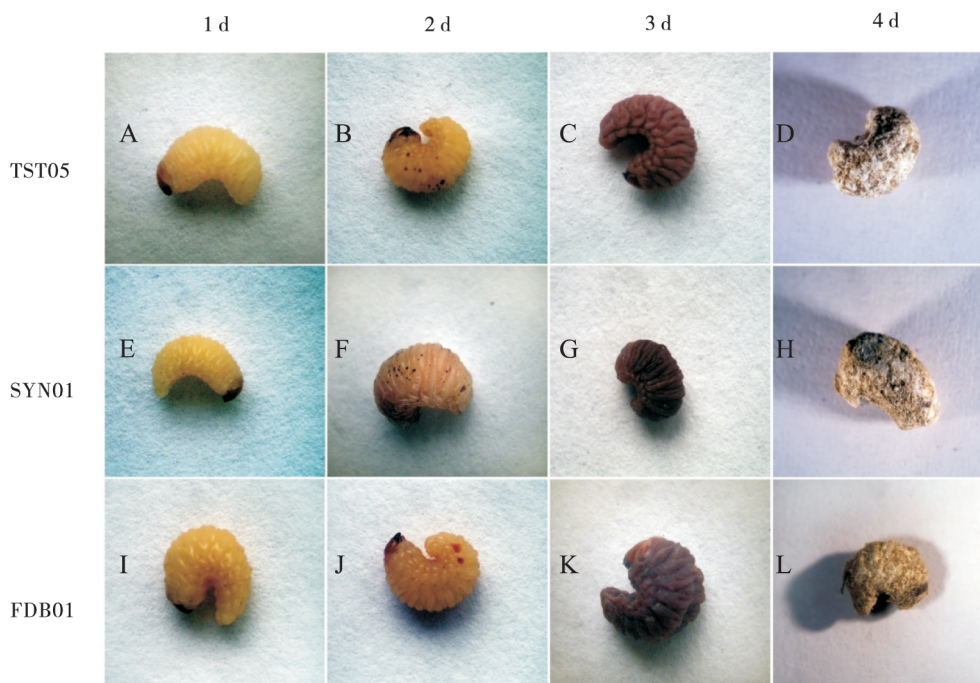


图2 栗实象甲幼虫染菌后的症状

Fig. 2 The symptoms of the diseased larvae of *Curculio davidi* infected with the three strains

注: A–D, 幼虫被 TST05 菌株感染后的第 1–4 天的外观症状; E–H, 幼虫被 SYN01 菌株感染后的第 1–4 天的外观症状; I–L, 幼虫被 FDB01 菌株感染后的第 1–4 天的外观症状。Note: A–D, infected larvae with the strain of TST05 appeared symptoms in 1–4 d; E–H, infected larvae with the strain of SYN01 appeared symptoms in 1–4 d; I–L, infected larvae with the strain of FDB01 appeared symptoms in 1–4 d.

## 2.3 菌株对栗实象甲的致死效果

染菌后经过连续8 d观察并统计死亡率, 结果显示, 3个菌株SYN01、FDB01、TST05的 $1 \times 10^8$ 孢子/mL孢子悬浮液对栗实象甲幼虫的感染均表现出较高致死率(图3)。在1–3 d时, 感染菌株TST05、FDB01和SYN01的幼虫累计校正死亡率分别是5.55%、5.55%、10.00%; 第3–6天, 3个菌株对幼虫的校正致死率分别为18%、31.11%、52.22%; 第6–8天, 3个菌株对幼虫

的累积校正死亡率分别为40%、44.4%、62.22%; 由此可见, 菌株SYN01对幼虫的累计致死率在第3天就高于另外两个菌株, 第3天后其致死率急剧上升, 在第6天就达到50%以上, 一直到第8天, 其致死率都显著高于另外两个菌株。菌株TST05与FDB01对幼虫的致死率在前4 d都相近, 4 d之后对幼虫的致死率开始明显增加, 一直到第8天都处于快速增长阶段, 其中, 菌株FDB01对幼虫的致死率在第5–8天期间都明显高

于 TST05。通过计算 3 个菌株 TST05、FDB01 和 SYN01 对幼虫的致死中时, 分别为 11.6 d、8.77 d、6.22 d (表 1)。说明菌株 SYN01 对幼虫的累积致死率最高, 致死速度最快, 菌株 FDB01 次之, TST05 的致死率最低, 致死速度也最慢, 它们之间具有差异显著性 ( $P < 0.05$ )。

表 1 3 个菌株对栗实象甲幼虫的校正死亡率回归分析与致死中时  
Table 1 The adjusted mortality regression analysis and the median lethal time of *Curculio davidi* Fdiraire larvae infected by the three fungal strains

菌株 Strain	方程 Equation	$R^2$	致死中时 (d) $LT_{50}$
SYN01	$y = 10.04x - 12.401$	0.9111	6.22
FDB01	$y = 6.984x - 11.29$	0.9336	8.77
TST05	$y = 5.414x - 8.9325$	0.9145	11.6

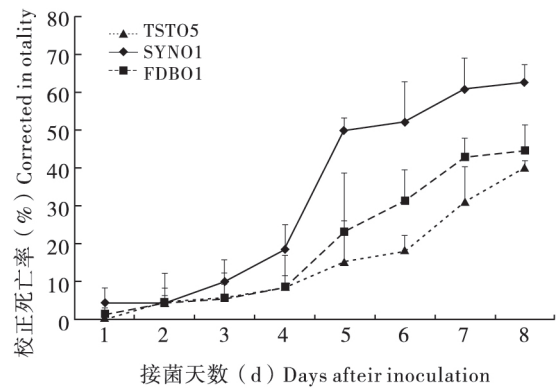


图 3 3 个菌株对栗实象甲幼虫校正死亡率  
Fig. 3 The corrected lethality rate of *Curculio davidi* larvae by the three strains

2.4 菌株胞外酶的活性及其与毒力的相关性

2.4.1 3 菌株 Prl 酶的活性与毒力的相关性

3 个菌株 TST05、FDB01、SYN01 分别以栗实象甲幼虫的虫体作为唯一碳源的专用培养基培养, 逐日测定各菌株的类枯草杆菌蛋白酶的酶活变化。结果显示 (图 4), 菌株 TST05、FDB01、SYN01 的蛋白酶活性在前 6 d 都呈现波动性上升趋势, 到第 6 天出现最大峰值, 分别为  $(175.56 \pm 0.7)$  U/mL、 $(172.74 \pm 2.32)$  U/mL、 $(195.71 \pm 5.41)$  U/mL。从酶活性的最大值与平均值看, 菌株 TST05 与菌株 FDB01 的 Prl 酶活性差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 而菌株 SYN01 的 Prl 酶活性最大值则明显高于与其他两株菌 ( $P < 0.05$ )。用菌株的 Prl 酶活性平均值与栗实象甲幼虫染菌后连续 8 d 的累积死亡率之间作回归分析, 得到回归方程式  $y = 0.4641x + 122.45$  ( $R^2 = 0.8854$ ), 说明菌株类枯草杆菌蛋白酶的活性与幼虫染菌死亡率之间的线性相关性显著。

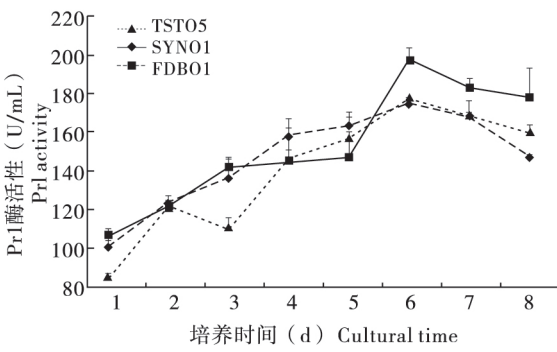


图 4 3 个菌株在栗实象甲虫体培养基上的 Prl 酶活性  
Fig. 4 Prl activity of three strains cultured on the baked dry larvae media of *Curculio davidi* larvae

2.4.2 3 菌株几丁质酶的活性与毒力的相关性

同样, 以栗实象甲幼虫的虫体作为唯一碳源的培养基培养 3 个菌株, 测定各菌株几丁质酶的活性变化。结果所示 (图 5), 菌株 TST05 与菌株 FDB01 的几丁质酶活性在第 1 天就具有较高值, 分别为  $(12.58 \pm 0.58)$  U/mL 和  $(13.06 \pm 1.16)$  U/mL, 菌株 TST05 在 1-4 d 呈下降趋势, 4-8 d 呈波浪式变动。菌株 FDB01 在第 2-4 天呈现低活性, 4-7 d 期间呈现稳定上升趋势。从酶活性最大值和平均值看, 菌株 FDB01 与菌株 TST05 的差异不显著 ( $P > 0.05$ ); 而菌株 SYN01 酶活性在第 3 天出现最大值  $(15.12 \pm 0.32)$  U/mL, 并显著高于另外两个菌株 ( $P < 0.05$ )。通过 3 个菌株几丁质酶活性平均值与栗实象甲幼虫染菌后连续 8 d 累计校正死亡率之间作线性回归分析, 得到回归方程式为  $y = 0.034x + 10.473$  ( $R^2 = 0.9328$ ), 说明菌株几丁质酶活性与幼虫染菌死亡率之间的线性相关性极显著。

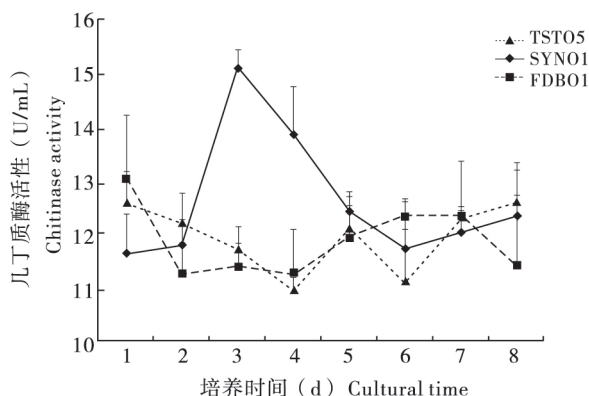


图5 3个菌株在栗实象甲虫体培养基上几丁质酶活性  
Fig. 5 Chitinase activity of the three strains cultured on the baked dry larvae media of *Curculio davidi* larvae

#### 2.4.3 3菌株脂肪酶的活性与毒力的相关性

同样,以栗实象甲幼虫的虫体作为唯一碳源的培养基培养3个菌株,测定各菌株的脂肪酶活变化。结果显示(图6),3个菌株的脂肪酶活性随时间均表现出先上升后下降的变化趋势。菌株TST05和FDB01的酶活性最大值出现在第2天,分别为 $(5.09 \pm 0.35)$  U/mL和 $(7.79 \pm 0.18)$  U/mL。第3-8天,菌株TST05的脂肪酶活性呈现波动性变化,并极显著地小于另外两个菌株( $P < 0.05$ )。菌株FDB01的脂肪酶活性在第3-8天处于相对高的活性范围,并呈现非常小的下降趋势;而菌株SYN01的脂肪酶活性在第1-4天期间呈现上升趋势,在第4天达到酶活高峰值 $(6.8 \pm 0.91)$  U/mL后开始下降,第5-8天波动比较平稳,与菌株FDB01的酶活性比较接近,二者之间显著差异( $P > 0.05$ )。从8 d脂肪酶平均值看,3个菌株之间差异性显著( $P < 0.05$ )。根据3个菌株脂肪酶活性平均值与染菌幼虫连续8 d累积校正死亡率之间作线性回归分析,得到回归方程式为 $y = 0.0354 + 2.4586x$ , ( $R^2 = 0.1201$ ),说明菌株致死幼虫过程与菌株脂肪酶的作用之间不具有直接线性相关性。

### 3 结论与讨论

栗实象甲是我国板栗种植业的重要害虫,以往防治主要采用树冠喷洒化学杀虫剂,防治交配和产卵期的成虫,而对于在果实内钻蛀危害的幼虫起不到防治效果,反而会污染环境。近年来,国外已经有个别研究显示白僵菌和绿僵菌对栗实

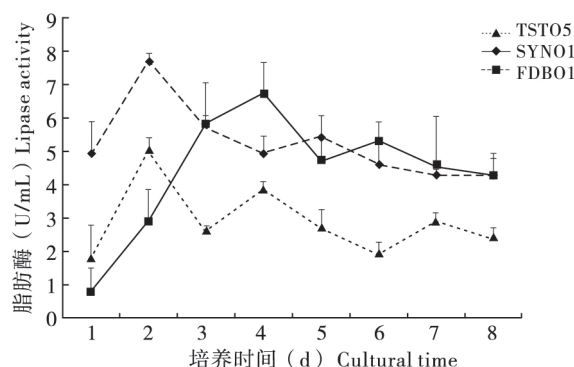


图6 3个菌株在栗实象甲虫体培养基上的脂肪酶活性  
Fig. 6 Lipase activity of the three strains cultured on the baked dry larvae media of *Curculio davidi* larvae

象甲有一定的防治效果(Ihara *et al.*, 2009),但是国内还没有相关的研究报道。

应用昆虫病原真菌防治栗实象甲,是针对脱果后入土的老熟幼虫在树冠下土壤中栖息时间长达8月的习性,以白僵菌和绿僵菌作为生物制剂施用在土壤中,使幼虫感染病菌得病死亡,以起到减少虫口和防治目的。本研究通过观察,掌握了在9月中旬到10月下旬期间,栗实象甲幼虫在板栗内的为害分为初期、中期、末期3个不同的阶段,总结了每个阶段幼虫的大小和形态特征,以及果实上幼虫蛀食的坑道和虫粪特点。观察到在此期间幼虫取食和发育特别快,在10月下旬绝大部分幼虫都能发育到老熟,钻出果壳,脱果入土。并且发现脱果入土的老熟幼虫,对土壤湿度要求比较高,一般在40%左右。这为科学利用白僵菌和绿僵菌作为生物制剂,在土壤中施用提供了科学依据。

为筛选出可用于防治栗实象甲的白僵菌菌株,本研究以本实验室拥有的3个球孢白僵菌菌株TST05、FDB01、SYN01对老熟幼虫作感染试验,观察了幼虫的染病症状,发现这3个菌株都可以使幼虫染病死亡,幼虫染菌后的症状包括:虫体活动减弱、体色变淡、体表出现色斑、体色变褐、出现死亡、体表出现菌丝和大量菌丝覆盖虫体。

病原真菌对害虫的致死率是其筛选菌株的重要指标。本研究结果显示,菌株SYN01对栗实象甲老熟幼虫的致死率最高,感染后8 d累积校正死亡率达到62.22%,致死中时6.22 d。而菌株TST05与FDB01的8 d累积校正死亡率分别为40%与44.4%,二者无显著差异( $P > 0.05$ ),

致死中时分别为 11.6 d 和 8.77 d。说明 SYN01 对栗实象甲老熟幼虫拥有更强的致死作用。

昆虫病原真菌入侵昆虫主要是通过体壁入侵, 昆虫体壁是昆虫抵御外来微生物入侵的第一道屏障, 昆虫体壁主要成分是蛋白质、几丁质和脂肪(方卫国, 2003)。病原真菌要成功进入血腔, 就需要克服这些障碍, 一般认为这个过程是在真菌分泌胞外酶对体壁进行降解, 破坏体壁结构, 与真菌的芽管和菌丝产生的机械压力形成的穿刺共同作用下完成的(St Leger *et al.*, 1987)。许多研究表明在昆虫病原菌入侵昆虫表皮的过程中, 产生的胞外酶的活性与病菌对昆虫致病力密切相关(林海萍等, 2008; Svedese *et al.*, 2013)。本研究以栗实象甲老熟幼虫的表皮作为唯一碳源, 模拟病原真菌入侵栗实象甲老熟幼虫表皮过程, 对病原真菌感染过程中分泌的蛋白质酶, 几丁质酶和脂肪酶进行了测定。结果显示在模拟病原真菌入侵板栗象甲老熟幼虫表皮过程中, 菌株 FDB01、TST05、SYN01 的类枯草杆菌蛋白酶, 几丁质酶和脂肪酶均表现出了先上升后下降的规律, 表明在分解栗实象甲老熟幼虫体壁过程中这 3 种酶均发挥着一定的作用。同时, 这 3 株白僵菌所分泌的这 3 种酶在最大酶活性值以及最大酶活性出现的时间上表现出一定的差异, 在一定程度上反映出了这 3 株白僵菌对栗实象甲老熟幼虫作用的时间和毒力上的差异。

昆虫病原真菌的胞外蛋白酶主要可以分为两大类, 一类是丝氨酸弹性凝乳蛋白酶 Pr1 (即类枯草杆菌蛋白酶), 另一类是丝氨酸类胰蛋白酶(Pr2)(St Leger *et al.*, 1987)。其中 Pr1 是一种碱性蛋白水解酶, 对昆虫表皮表现出很强的特异性, 而 Pr2 是多酶复合体的同工酶, 对酪蛋白的活性很高, 但是对昆虫表皮蛋白质的活性很低。因此, 本研究选取类枯草杆菌蛋白酶作为指标, 进行测定。结果显示, 在 3 个菌株 TST05、FDB01、SYN01 降解栗实象甲表皮过程中, Pr1 的活性均有明显的升高, 其中菌株 SYN01 的酶活性平均值为  $(150.9032 \pm 10.29)$  U/mL, 比其他两个菌株的都高。经过将 Pr1 酶与连续 8 d 的累计死亡率作线性回归分析,  $R^2 = 0.8854$ , 线性相关性显著, 说明病原菌在感染入侵昆虫体壁过程中, 菌种 Pr1 在降解昆虫体壁的蛋白质成分, 对病菌入侵发挥了关键作用。Pr1 的活性变化与幼虫的染病死亡率之间的直线关系, 说明 Pr1 可以作为筛选病原真菌的一

个毒力指标, 这与 St Leger 等(1987)和 Mohanty 等(2008)对其他昆虫的研究结果是一致的。

病原真菌分泌的几丁质酶一般认为包括两大类, 一类是几丁质酶, 另一类是 N-乙酰葡萄糖胺酶, 其中几丁质酶是一种诱导酶, 受到本身降解产物 N-乙酰葡萄糖胺的诱导与抑制作用(St Leger *et al.*, 1987)。昆虫体壁中含有大量的几丁质, 与蛋白质形成嵌合结构, 是抵御外来微生物侵袭的重要屏障。Bernier 等(1989)用昆虫几丁质合成的抑制素和绿僵菌处理烟草天蛾 *Manduca sexta* 幼虫, 发现几丁质合成抑制素处理过的表皮更有利于绿僵菌的入侵, 也说明了几丁质酶对真菌入侵昆虫起着重要的作用。本研究结果显示, 在降解栗实象甲幼虫体壁过程中菌株的几丁质酶活性都有升高, 其中菌株 SYN01 的几丁质酶活性最大值为  $(15.12 \pm 0.32)$  U/mL, 明显高于菌株 TST05 的  $(12.58 \pm 0.58)$  U/mL 和菌株 FDB01 的  $(13.06 \pm 1.16)$  U/mL ( $P < 0.05$ )。几丁质酶活性的平均值与染菌幼虫连续 8 d 累计校正死亡率作线性回归分析, 线性相关性显著,  $R^2 = 0.9328$ 。说明几丁质酶在白僵菌入侵栗实象甲老熟幼虫过程中起着重要的作用, 几丁质酶活性与菌株的毒力直接相关, 可以作为筛选菌株的一个毒力指标。

在本研究中脂肪酶活性有所提高, 显示脂肪酶参与了栗实象甲体壁的降解过程。其中菌株 FDB01 的酶活最大值为  $(7.79 \pm 0.18)$  U/mL, 明显高于 TST05 的  $(5.09 \pm 0.35)$  U/mL, 但与菌株 SYN01 的  $(6.8 \pm 0.91)$  U/mL 相比, 无明显差异。将脂肪酶平均值与 8 d 的累积校正死亡率做线性回归分析, 线性相关系数  $R^2 = 0.1201$ , 说明无明显线性相关。冯明光等(1998)在研究白僵菌脂肪酶与菌株毒力相关性时, 认为脂肪酶不适宜作为菌株的一个毒力指标, 与本研究的结果一致。但是, 本研究发现菌株的脂肪酶在 1-4 d 内活性较高, 而后期活性较低, 说明白僵菌的脂肪酶是在病菌感染的前期发挥作用, 这与昆虫表皮蜡质处于昆虫表皮的上层结构特点是一致的, 当病菌入侵昆虫体壁时, 最先接触的应该是蜡质层, 然后才是蛋白质和几丁质层。

综上所述, 本研究采用的球孢白僵菌 3 个菌株中, 原寄主为松毛虫的菌株 SYN01 对栗实象甲幼虫的致死率和致死中时都明显优于其他两个菌株, 在降解象甲老熟幼虫体壁过程的试验中, 该菌株的蛋白酶和几丁质酶活性的最大值也均高于



其他两个菌株。而蛋白酶和几丁质酶的酶活性与幼虫累积校正死亡率之间呈显著的线性相关关系。由此可以认为, 菌株 SYN01 是 3 个菌株中最佳的病原真菌菌株, 可以考虑用于防治栗实象甲。

### 参考文献 (References)

- Bernier L, Cooper RM, Charnley AK, *et al.* Transformation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* to benomyl resistance [J]. *Fems. Microbiology Letters*, 1989, 60 (3): 261 – 265.
- Cao GC. Studies on Resistance of Diamondback Moth *Plutella xylostella* (L.) to Tebufenozide and the Mechanisms [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2007. [曹广春. 小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 对虫酰肼的抗性及其机理研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2007]
- Fang WG. Cloning and Characterization of Cuticle Degrading Enzyme Genes from Entomopathogenic Fungi and Improvement of *Beauveria bassiana* by Genetic Modification [D]. Chongqing: Southwest Agricultural University, 2003. [方卫国. 昆虫病原真菌降解寄主体壁酶基因的克隆及球孢白僵菌高毒力重组菌株的获得 [D]. 重庆: 西南农业大学, 2003]
- Feng MG. Reliability of extracellular protease and lipase activity of *Beauveria bassiana* isolates used as their virulence indices [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 1998, 38 (6): 461 – 467. [冯明光. 胞外蛋白酶和脂酶活性作为球孢白僵菌毒力指标的可靠性分析 [J]. 微生物学报, 1998, 38 (6): 461 – 467]
- Huang LN. The occurrence rule damage characteristics and integrated control of *Curculio davidi* Fairmaire [J]. *Friends of Farmers to Get Rich*, 2014, 22: 81 – 81. [黄莉宁. 栗实象的发生规律、危害特点及综合防治 [J]. 农民致富之友, 2014, 22: 81 – 81]
- Ihara F, Toyama M, Higaki M, *et al.* Comparison of pathogenicities of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to chestnut pests [J]. *Applied Entomology & Zoology*, 2009, 44 (1): 127 – 132.
- Kepeneci I, Gokce A, Gaugler R. Virulence of three species of entomopathogenic nematodes to the chestnut weevil, *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae) [J]. *Nematropica*, 2004, 34 (2): 199 – 204.
- Li CY, Kong FT. The damage characteristics and control strategy of *Curculio davidi* Fairmaire [J]. *Fruit Growers' Friend*, 2012, 2: 43 – 43. [李春野, 孔凡涛. 栗实象鼻虫的危害特点及防治对策 [J]. 果农之友, 2012, 2: 43 – 43]
- Lin HP, Wei JY, Mao SF, *et al.* Correlation between protease, chitinase and lipase activities and virulence of *Beauveria bassiana* against *Monochamus alternates* [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2008, 24 (3): 290 – 292. [林海萍, 魏锦瑜, 毛胜凤, 等. 球孢白僵菌蛋白酶、几丁质酶、脂肪酶活性与其毒力相关性 [J]. 中国生物防治, 2008, 24 (3): 290 – 292]
- Mohanty SS, Raghavendra K, Dash AP. Induction of chymotrypsinogen (Pr1) of *Metarhizium anisopliae* and its role in causing mortality to mosquito larvae [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2008, 24 (10): 2283 – 2288.
- Qu DZ, Huang YC, Zhang YR. The biological property and integrated control of *Curculio davidi* Fairmaire [J]. *Shaanxi Forest Science and Technology*, 2009, 1: 71 – 73. [屈顶柱, 黄应成, 张宜仁. 栗实象甲生物学特性及综合防治技术研究 [J]. 陕西林业科技, 2009, 1: 71 – 73]
- Speranza S, Paparatti B, Bounous G, *et al.* Chemical control of chestnut weevils in central Italy [J]. *Acta Horticulturae*, 2010, 866 (3): 411 – 415.
- Sun SF, uo YG, Tang YJ, *et al.* Observation on the life history of *Curculio bimaculatus* Faust and its control with *Paecilomyces farinosus* [J]. *Forest Pest and Disease*, 2004, 23 (5): 21 – 24. [孙绍芳, 郭亚钢, 唐永军, 等. 二斑栗实象甲生活史观察及粉拟青霉菌防治试验 [J]. 中国森林病虫, 2004, 23 (5): 21 – 24]
- St Leger RJ, Cooper RM, Charnley AK. Production of cuticle – degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticles from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta* [J]. *Journal of General Microbiology*, 1987, 133 (5): 1371 – 1382.
- Silva WOB, Mitidieri S, Schrank A, *et al.* Production and extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40 (1): 321 – 326.
- Svedese VM, Tiago PV, Bezerra JDP, *et al.* Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and production of cuticle – degrading enzymes in the presence of *Diatraea saccharalis* cuticle [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2013, 12: 6491 – 6497.
- Wei MX, Liu RJ. The occurrence and control of the main pest of Jingdong Chestnut [J]. *Beijing Agriculture*, 2014, 30: 158 – 159. [魏敏宣, 刘瑞江. 京东板栗主要病虫害的发生与防治 [J]. 北京农业, 2014, 30: 158 – 159]
- Yuan SJ, Sun Y, Wang XD, *et al.* The biological property and control of *Curculio davidi* Fairmaire [J]. *Liaoning Agricultural Sciences*, 2010, 5: 9 – 60. [袁少杰, 孙羽, 王晓东, 等. 栗实象鼻虫生物学特性与防治 [J]. 辽宁农业科学, 2010, 5: 9 – 60]
- Yu WJ, Song XS, Sun Y. Progress on the control of *Curculio davidi* Fairmaire [J]. *Jilin Agriculture*, 2015, 9: 94 – 95. [遇文婧, 宋小双, 孙妍. 栗实象甲的防治研究进展 [J]. 吉林农业, 2015, 9: 94 – 95]