

微生物

杀虫剂的研究与应用

邓彩萍 编著

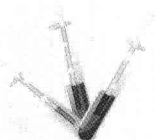


中国农业科学技术出版社

微生物

杀虫剂的研究与应用

邓彩萍 编著



中国农业科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

微生物杀虫剂的研发与应用 / 邓彩萍编著. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2012. 5

ISBN 978 - 7 - 5116 - 0891 - 8

I. ①微… II. ①邓… III. ①微生物杀虫剂 IV. ①TQ453. 5

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 080051 号

责任编辑 张孝安

责任校对 贾晓红

出 版 者 中国农业科学技术出版社

北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081

电 话 (010)82109708(编辑室) (010)82109704(发行部)

(010)82109703(读者服务部)

传 真 (010)82109708

网 址 <http://www.castp.cn>

经 销 者 新华书店北京发行所

印 刷 者 北京科信印刷有限公司

开 本 787mm × 1 092mm 1/16

印 张 10

字 数 160 千字

版 次 2012 年 5 月第 1 版 2012 年 5 月第 1 次印刷

定 价 28.00 元

版权所有 · 翻印必究

作者简介

邓彩萍，女，汉族，生于 1979 年，博士，讲师。2009 年毕业于北京林业大学森林保护专业，获农学博士学位。同年任职于山西农业大学林学院森林保护系教师。目前参与国家自然科学基金项目（31100483）及林业公益性行业科研专项“枣树裂果综合防控技术体系研究”子课题的研究。

前 言

我国是一个病虫发生频率、农药用量较大的国家，但随着长期使用化学农药，农业害虫抗药性问题越来越凸显，对环境生态造成了严重的影响，同时增加了农产品的农药残留，既危害了人民群众的健康安全，也严重影响了我国农产品的出口创汇和市场准入，目前世界各国都在加强控制化学农药的使用。另外，全球气候的变化，外来物种的入侵，种植业结构的调整，这些变化导致处于农田生态系统中层，起着重要作用的昆虫也随之发生了变化，重要害虫的种类和发生规律出现了新动向。另一方面，粮食安全与可持续环境友好型农业生态系是新形势下我国新农村建设的总体目标，也是农业科技工作者的科研目标。这一系列因素使得生物防治日益被人们所重视，生物农药必将成为将来病虫害防治的研究方向和主要手段。

微生物杀虫剂与化学合成杀虫剂相比，具有以下特点：①防治对象专一，选择性高；②药效作用较缓慢；③药效易受外界因素（温度、湿度、光照等）的影响；④对生态环境的影响小。这些特点使微生物杀虫剂成为适用于害虫综合防治的一类农药。用微生物防治害虫的研究始自 19 世纪，到 20 世纪上半期逐渐进入开发实用阶段。发展较快的是真菌和细菌杀虫剂，到 20 世纪 50 年代，以苏云金杆菌为代表的细菌杀虫剂已实现工业生产。70 年代以来，病毒杀虫剂开始商品化。微生物杀虫剂是生物科学与工程技术结合发展的产物，随着现代生物工程的迅速发展，微生物杀虫剂将有很大的开发前景。

本书作者主要从事杀虫微生物方面的研究，结合前人发表的论著，详

细介绍近几年关于微生物杀虫剂的研发和应用现状，以供读者参考。本书由山西农业大学引进人才科研启动基金（XB2009011）、山西省科技攻关项目（20090311030）、山西省归国留学人员科研基金（2002037）共同资助完成。此外由于编者水平有限，错误和疏漏之处在所难免，敬请读者批评指正！

邓彩萍
2012 年 3 月

目 录

第一章 真菌杀虫剂	(1)
第一节 白僵菌	(2)
一、白僵菌的分类及生物学特性	(3)
二、白僵菌的侵染机制	(9)
三、白僵菌的生产	(15)
四、多样化的剂型及其防治应用	(18)
第二节 绿僵菌	(23)
一、绿僵菌的分类地位和生物学特性	(23)
二、绿僵菌致病机理	(25)
三、绿僵菌的生产	(29)
四、绿僵菌的应用	(31)
第三节 蜡蚧轮枝菌	(33)
一、蜡蚧轮枝菌的分类及生物学特性	(34)
二、蜡蚧轮枝菌的致病机理	(35)
三、蜡蚧轮枝菌的生产工艺	(38)
四、蜡蚧轮枝菌的应用	(39)
第四节 其他虫生真菌	(40)
一、拟青霉	(40)
二、座壳孢菌	(43)
三、虫霉目真菌	(44)
四、食线虫真菌	(45)
第二章 细菌杀虫剂	(54)
第一节 苏云金芽孢杆菌	(55)
一、苏云金芽孢杆菌分类及生物学特性	(55)

二、苏云金芽孢杆菌的活性因子	(57)
三、苏云金芽孢杆菌杀虫作用机理	(60)
四、苏云金芽孢杆菌生产和应用	(61)
五、昆虫的抗性及其管理	(64)
第二节 金龟子芽孢杆菌	(64)
一、金龟子芽孢杆菌的生物学特性	(65)
二、金龟子芽孢杆菌的致病机理	(65)
三、金龟子芽孢杆菌的生产和应用	(66)
第三节 球形芽孢杆菌	(68)
一、球形芽孢杆菌的生物学特性	(68)
二、球形芽孢杆菌的杀蚊毒素和杀虫机理	(69)
三、球形芽孢杆菌的研制与应用	(70)
第四节 粘质沙雷氏菌	(71)
一、粘质沙雷氏菌的生物学特性	(71)
二、粘质沙雷氏菌的致病机理	(71)
三、粘质沙雷氏菌的应用	(72)
第三章 病毒杀虫剂	(77)
第一节 病毒的概述	(77)
一、病毒的定义	(77)
二、病毒的化学组成	(78)
三、病毒的分类和命名	(78)
四、病毒的增殖	(82)
五、理化因素对病毒的影响	(84)
六、病毒的收集保藏	(86)
第二节 病毒杀虫剂	(87)
一、病毒杀虫剂的特点	(87)
二、病毒杀虫剂的开发	(88)
第三节 DNA 病毒杀虫剂	(92)
一、核型多角体病毒杀虫剂	(92)

二、颗粒体病毒杀虫剂	(101)
三、昆虫痘病毒杀虫剂	(104)
四、浓核症病毒杀虫剂	(105)
第四节 RNA 病毒杀虫剂	(107)
一、质型多角体病毒生物学特性	(107)
二、质型多角体病毒致病机理	(108)
三、质型多角体病毒生产及应用	(108)
第五节 病毒杀虫剂的基因工程改造	(109)
一、病毒杀虫剂基因改造技术	(111)
二、病毒杀虫剂的发展展望	(115)
第四章 微孢子虫杀虫剂	(119)
一、微孢子虫生物学特性及分类地位	(119)
二、微孢子虫的诊断方法	(123)
三、微孢子虫的致病机理	(124)
四、微孢子虫的传播途径	(125)
五、微孢子虫的人工繁殖及应用	(127)
第五章 昆虫病原线虫杀虫剂	(131)
一、昆虫病原线虫的分类和生活史	(132)
二、昆虫病原线虫的共生菌	(133)
三、昆虫病原线虫的致病机理	(135)
四、昆虫病原线虫的生产	(138)
五、昆虫病原线虫的应用	(143)
六、高活性昆虫病原线虫的改造	(147)

第一章 真菌杀虫剂

虫生真菌是昆虫病原微生物中的最大类群（表 1-1），也是自然界控制昆虫种群数量的一个重要因子。据野外调查越冬昆虫发现，昆虫疾病中约有 60% 是由真菌引起的。真菌杀虫剂作为微生物杀虫剂的重要类群，因其具有与环境的相容性、易于工业化生产、可自然扩散以及持续控制害虫等优点而作为化学农药的替代品，备受国内外学者及产业界的关注。目前，国外已有 50 多种真菌杀虫剂登记注册，其中白僵菌和绿僵菌占到一半以上，生产的国家达 14 个。世界范围内 14 个国家先后登记注册或在市场上销售的真菌杀虫剂产品有 140 余种。从真菌杀虫剂的注册情况来看，真菌杀虫剂的种类正向着多样化的方向发展。在已注册产品中，至少有 11 种昆虫病原真菌，包括蜡蚧轮枝菌（*Verticillium lecanii*）、金龟子绿僵菌（*Metarhizium anisopliae*）、金龟子绿僵菌蝗变种（*Metarhizium anisopliae* var. *acridum*）、黄绿绿僵菌（*Metarhizium flavoviride*）、汤普生被毛孢（*Hirsutella thompsonii*）、新蚜虫疔霉（*Erynia neoaphidis*）、球孢白僵菌（*Beauveria bassiana*）、布氏白僵菌（*B. brongniartii*）和莱氏野村菌（*Nomuraea rileyi*）、玫烟色拟青霉（*Paecilomyces fumosoroseus*）和大链壶菌（*Lagenidium giganteum*）。同时，真菌杀虫剂防治的目标更加明确。在 140 多种注册产品中，防治的主要目标害虫约 30 种，其中，很多产品的目标寄主仅有一种，如美国的 BioSave 仅防治家蝇，Boverin 仅防治马铃薯叶甲，巴西的 Bio-control 仅防治甘蔗沫蝉。大多数产品所标注的防治对象不超过 3 种。

表 1-1 虫生真菌较常见的 32 属

亚门	纲	属
鞭毛菌亚门 Mastigomycotina	壶菌纲 Chytridiomycetes	雕蚀菌属 <i>Coelomomyces</i> , 蝇壶菌属 <i>Myiophagus</i>
	卵菌纲 Oomycetes	链壶菌属 <i>Lagenidium</i>
接合菌亚门 Zygomycotina	接合菌纲 Zygomycetes	团孢霉属 <i>Massospora</i> , 虫霉属 <i>Entomophthora</i> , 虫疫霉属 <i>Erynia</i> , 虫疔霉属 <i>Pandora</i> , 三孢霉属 <i>Triplosporium</i> , 耳霉属 <i>Conidiobolus</i>
	子囊菌亚门 Ascomycotina	核菌纲 Pyrenomycetes
		虫草菌属 <i>Cordyceps</i> , 虫壳菌属 <i>Torrubiella</i> , 赤壳菌属 <i>Nectria</i>
	不整囊菌纲 Plectomycetes	球囊霉属 <i>Ascospaera</i>
担子菌亚门 Basidiomycotina	层菌纲 Hymenomycetes	隔担耳菌属 <i>Septobasidium</i>
		节丛孢属 <i>Arthrobotrys</i> , 白僵菌属 <i>Beauveria</i> , 蚊霉属 <i>Culicinomyces</i> , 绿僵菌属 <i>Metarhizium</i> , 野村菌属 <i>Nomuraea</i> , 青霉属 <i>Penicillium</i> , 曲霉属 <i>Aspergillus</i> , 拟青霉属 <i>Paecilomyces</i> , 球束梗孢属 <i>Gibellula</i> , 多毛孢属 <i>Hirsutella</i> , 枝束梗孢属 <i>Synnemalium</i> , 镰刀菌属 <i>Fusarium</i> , 链格孢属 <i>Alternaria</i> , 芽枝霉属 <i>Cladosporium</i> , 轮枝孢属 <i>Verticillium</i> , 层梗孢属 <i>Hymenostilbe</i> , 共胶霉属 <i>Syngliocladium</i>
半知菌亚门 Deuteromycotina	丝孢菌纲 Hyphomycetes	
	腔孢菌纲 Coelomycetes	座壳孢属 <i>Aschersonia</i>

引自王记祥等, 2009

在我国, 真菌制剂的研究开发已有 30 多年的历史。尽管真菌杀虫剂的使用比较频繁、应用面积较大, 并取得了很好的防治效果, 但是, 真菌杀虫剂产品的注册近些年来仅在少数几个真菌生物农药企业的带领下才取得突破。截至 2011 年 12 月, 我国仅有 5 种虫生真菌登记注册, 其中, 球孢白僵菌产品主要用于防治松墨天牛、竹蝗、美国白蛾和蛴螬等害虫, 绿僵菌用于防治蝗虫和蟑螂, 厚孢轮枝菌和淡紫拟青霉主要用于防治根结线虫, 块状耳霉用于防治蚜虫。有鉴于此, 今后有必要对真菌杀虫剂进行大规模的筛选, 开发出系列产品, 要体现真菌杀虫剂的多样性及防治寄主的多样性, 这样才能很好地满足市场和真菌杀虫剂产业发展的需要。

第一节 白僵菌

中国是世界上较早记载虫生真菌的国家之一, 早在 2 000 多年前, 《神农本

草经》中就记载了受白僵菌属感染而死亡的家蚕幼虫（白僵蚕）具有药用价值。这是人类对白僵菌的最早记录。1835年，意大利人 Bassi 首次用试验证明了球孢白僵菌（*Beauveria bassiana*）导致蚕病在法国、意大利等国的大流行（王记祥等，2009）。球孢白僵菌是一种重要的昆虫病原真菌，其地理分布广泛，寄主种类多，侵染 15 目、149 科、521 属、707 种。此外，还有至少 6 科、7 属、13 种蜚蠊目寄主（李增智，1988），在野外调查越冬昆虫中，因真菌致病死亡的昆虫约占 60%，而因白僵菌致死的昆虫占真菌致死昆虫总数的 21%（蒲蛰龙，1994）。长期以来，白僵菌作为害虫生物防治的重要因子受到广泛关注和深入研究。

一、白僵菌的分类及生物学特性

1. 白僵菌的分类

白僵菌属（*Beauveria Vuillemin*）隶属于半知菌亚门、丝孢纲、丛梗孢目、丛梗孢科、白僵菌属。随着对白僵菌分子进化和系统发育的研究，又将白僵菌重新进行了归类组合。最近美国生物技术信息中心（NCBI）（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）将白僵菌归类于双核亚界（Dikarya）、子囊菌门（Ascomycota）、盘菌亚门（Pezizomycotina）、粪壳菌纲（Sordariomycetes）、肉座菌亚纲（Hypocreomycetidae）、肉座菌目（Hypocreales）、虫草菌科（Cordycipitaceae）、虫草属（*Cordyceps*）。

在传统的分类方法中，白僵菌分生孢子和产孢结构等的形态特征是白僵菌属分类的主要依据。由于形态特征常会因营养条件和寄主的不同而发生变异，而且对于形态特征不明显的菌株用传统的方法很难准确鉴定，所以，以形态特征为主，同时，依据生理生化指标和核酸指标，对白僵菌属种进行分类鉴定更为准确和科学。鉴定白僵菌的生物化学方法包括水解酶类、同工酶类和血清学方法，其中水解酶和同工酶研究主要是针对酯酶、醛缩酶、蛋白水解酶、过氧化氢酶、酸性磷酸酶和碱性磷酸酶，血清学方法是利用差速离心法纯化白僵菌的分生孢子，经甲醛灭活后以静脉注射法免疫家兔，制取抗血清，然后进行相互凝集试验和相互吸收试验；形态学鉴定标准包括分生孢子、分生孢子梗、产孢轴和产孢细胞的形状和大小，以及菌落的形态和颜色等。虽然采用这些方法

能够确定白僵菌属内种的分类,但是,由于环境、寄主和生理条件上的差异,使白僵菌产生丰富的遗传多样性,所以,即使采用生物化学方法对白僵菌进行分类鉴定仍有一定的局限性(高红等,2011)。

1993年开始,分子生物学技术广泛用于昆虫致病性真菌的分类和鉴定。例如,利用特殊DNA探针法、RAPD法、SSCP法、端粒指纹法、AFLPs、SCAR、SSR、mtDNA-RFLP以及ISSR法等可以鉴别具有特异性的白僵菌。

2005年,Rehner等对不同国家和地区的86株白僵菌进行了核糖体内转录间隔区(ITS)和延长因子的分析,最终将白僵菌分为A-F 6个进化枝:A-球孢白僵菌,包括全世界分布的有性和无性型球孢白僵菌(或称球孢虫草菌(*Cordyceps bassiana*));B-布氏白僵菌;C-包含无性型并且源于欧洲和北美洲的球孢白僵菌(*B. bassiana* cf);D-苏格兰白僵菌和蠕孢白僵菌;E-来自亚洲的包括无性型和有性型白僵菌;F-多形白僵菌(Rehner S A and Buckley E A., 2005)。目前,学界都以这6个分支为准。在我国目前已发现的白僵菌有4种,即球孢白僵菌、布氏白僵菌、多形白僵菌和苏格兰白僵菌,其中,球孢白僵菌和布氏白僵菌比较常见。2001年,李增智等首次发现球孢白僵菌的有性型,1997年在安徽省牯牛降自然保护区首次发现多形白僵菌(黄勃等,1997),2007年又在安徽省宣州市敬亭山发现了苏格兰白僵菌(黄勃等,2007)。下面是白僵菌属6个种的主要形态特征。

(1) 球孢白僵菌 [*Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.]

菌丝具隔膜,直径 $1.15 \sim 2.00 \mu\text{m}$,透明无色,菌落平坦,粉状或如新碎粉笔状,表面白色至淡乳色,在马铃薯冻粉培养基底部无色。分生孢子梗的分枝或小枝可多次直角分叉,聚集成团,分生孢子梗与主枝或侧枝着生部位多成直角。分生孢子球形,直径 $2.00 \sim 2.15 \mu\text{m}$,着生在产孢细胞延伸而成的之字形结构上,产孢细胞为瓶状,多变化,由腹端向上逐渐变细(图1-1)。

(2) 布氏白僵菌 [*Beauveria brongniartii* (Saccardo)]

也称卵孢白僵菌。菌落表面为白色、乳色至浅黄色,絮状、茸状或粉状。菌丝细长透明有隔,产孢细胞形状不定,瓶状或丝状,分生孢子呈椭圆形或亚圆形(纵径 $2.0 \sim 6.0 \mu\text{m}$ ×横径 $1.5 \sim 3.0 \mu\text{m}$),着生在由产孢细胞顶部延伸而成的之字形丝状结构上(图1-2)。

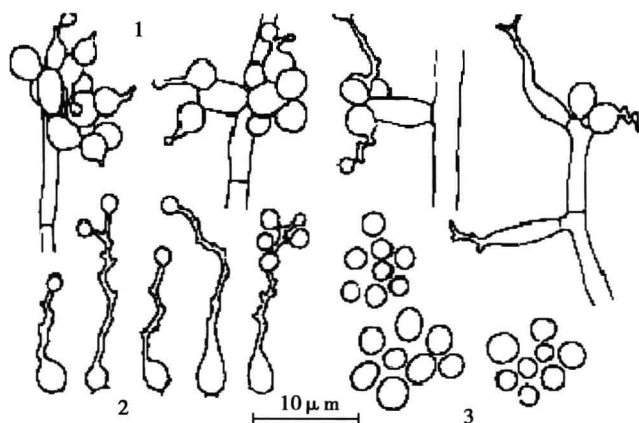


图 1-1 球孢白僵菌的产孢结构和分生孢子

1. 产孢结构; 2. 产孢细胞; 3. 分生孢子

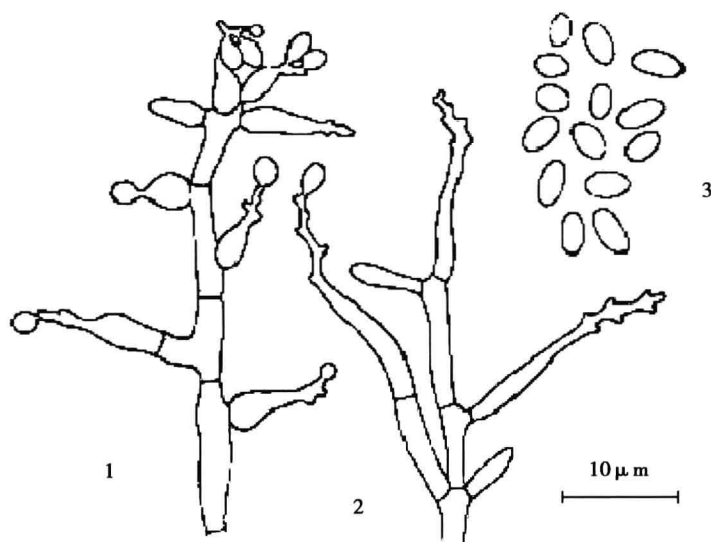


图 1-2 布氏白僵菌在不同培养基上的产孢结构和分生孢子

1. 在燕麦片培养基上的产孢结构; 2. 在 2% 麦芽琼脂培养基上的产孢结构; 3. 分生孢子

(3) 多形白僵菌 [*Beauveria amorphae* (Höhn)]

菌丝无色，光滑，有隔，直径 $1.1 \sim 1.7 \mu\text{m}$ ，产孢细胞轮生于菌丝或孢囊

上,由多个产孢细胞形成一个轮状结构,每轮产孢细胞最多可达8个,其基部球形、近球形或椭圆形,直径为 $2.1 \sim 3.2 \mu\text{m}$;基部延伸出 $18 \mu\text{m}$ 长的之字形结构产孢轴,其上具明显小齿突,产生较多的分生孢子。分生孢子透明、光滑,多数圆筒形,少数倒卵形,圆筒形孢子偶弯曲,纵径 $3.5 \sim 5.0 \mu\text{m}$,横径 $1.5 \sim 2.0 \mu\text{m}$ (图1-3)。

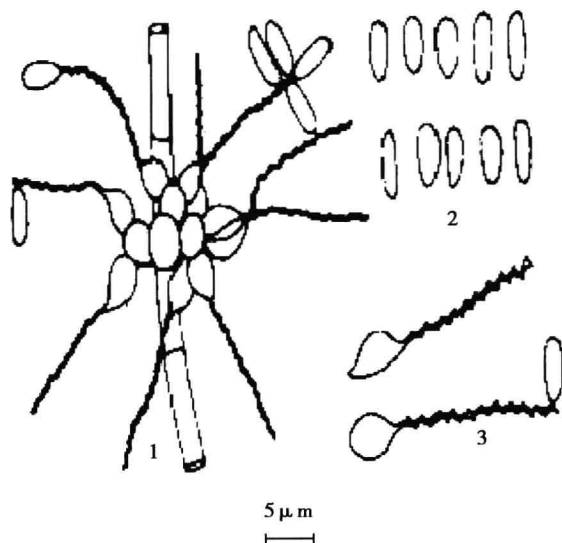


图1-3 多形白僵菌的分生孢子和产孢结构

1. 产孢结构; 2. 分生孢子; 3. 瓶梗(产孢细胞)

(4) 苏格兰白僵菌 [*Beauveria caledonica*]

菌落粉状,起初白色,后变为灰奶油色,背面浅棕黄色。菌丝无色光滑,直径为 $1.5 \sim 2.0 \mu\text{m}$,产孢细胞浓密簇生于菌丝、分生孢子梗或膨大的泡囊上,球形至瓶形,产孢细胞大小为 $2.4 \sim 5.7 \mu\text{m} \times 1.9 \sim 3.3 \mu\text{m}$,产孢轴长约 $14 \mu\text{m}$,轴上具小齿突,呈膝状弯曲。产孢细胞和泡囊常倍增,在分生孢子梗或菌丝上聚成相当密实的孢子头。分生孢子无色,光滑,单细胞,多为短圆筒形,少为椭圆形,两端通常钝圆。分生孢子大小为 $2.5 \sim 6.5 \mu\text{m} \times 1.3 \sim 2.2 \mu\text{m}$ (图1-4)。

(5) 黏孢白僵菌 [*Beauveria velata*]

菌落透明有隔,直径 $2.0 \sim 4.0 \mu\text{m}$,淡黄色至浅褐色,孢子形成后表面粉末状,背面起初无色,以后变黄色。4~8个产孢细胞成束着生在成熟的菌丝分

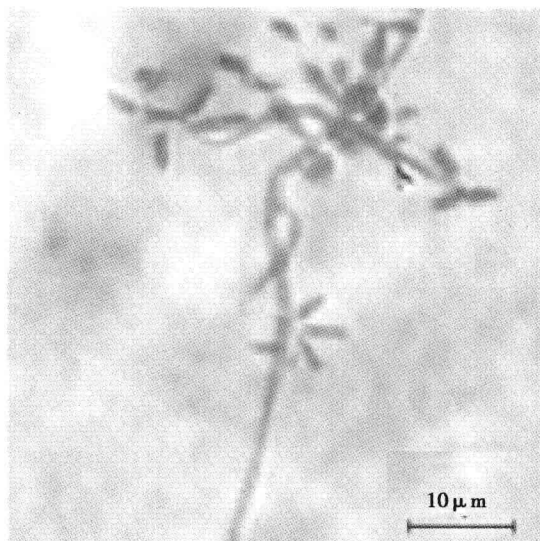


图 1-4 苏格兰白僵菌的瓶形产孢细胞

支上，基部膨大呈球形（直径 $2.5 \sim 3.0 \mu\text{m}$ ），顶端延伸出短轴丝。分生孢子透明偶见表面光滑，但常常被具有凸起松散的胶质层包被，孢子球形或椭圆形，直径 $3.0 \sim 4.0 \mu\text{m}$ （图 1-5）。

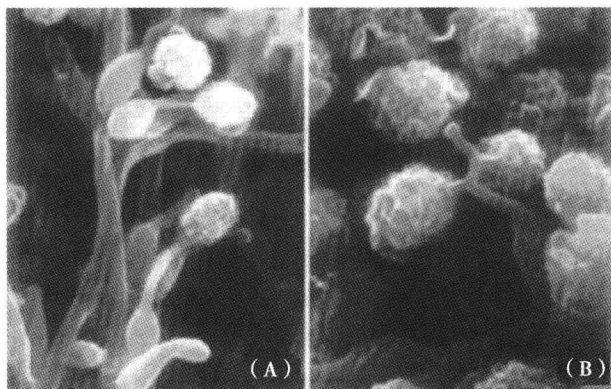


图 1-5 黏孢白僵菌产孢结构的扫描电子显微镜观察

A. 分生孢子梗 ($\times 4\ 000$)；B. 部分产孢细胞显示花序合轴和疣状凸起的孢子 ($\times 6\ 000$)

(6) 蠕孢白僵菌 [*Beauveria vermiconia*]

菌丝透明表面光滑，直径 $1.5 \sim 3.5 \mu\text{m}$ ，常常是二分支。分生孢子形成器 (conidial apparatus) 紧密成簇，由一群膨大的细胞 ($5.0 \sim 6.0 \mu\text{m} \times 3.0 \sim 4.0 \mu\text{m}$) 进一步分支产生产孢细胞。产孢细胞有一个椭圆或瓶状大小为 $4.0 \sim 5.0 \mu\text{m} \times 2.0 \sim 2.5 \mu\text{m}$ 的基部，顶部延伸出一个之字形弯形或镰刀形，外侧 $2.5 \mu\text{m}$ ，内侧 $1.0 \sim 1.5 \mu\text{m}$ (图 1-6)。

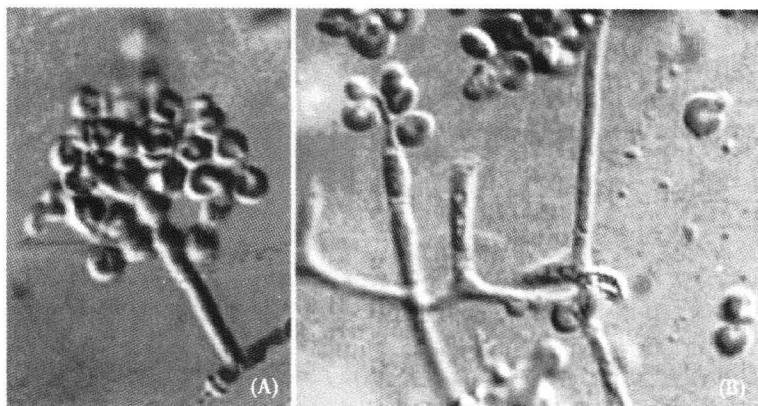


图 1-6 蠕孢白僵菌分生孢子 (A) 和产孢结构 (B) 的光学显微镜观察 ($\times 1600$)

注：图 1-1 至图 1-6 均引自高红等，2011

2. 白僵菌的生物学特性

白僵菌的分生孢子在适宜的温度、湿度条件下首先吸水膨胀，体积比吸水前增大 $2 \sim 3$ 倍，随后开始萌发，产生芽管。在产生芽管前，分生孢子内的一个细胞核分裂为 2 个，在接近细胞核的地方孢子壁向外凸起形成芽管，其中一核进入芽管内，留在孢子内的核可继续分裂，形成第二和第三根芽管。芽管内的核继续分裂，形成多核细胞的菌丝。在 28°C 、高湿条件下培养白僵菌孢子，最快在接种后 $3.5 \sim 4\text{h}$ 便开始萌发， 8h 后萌发的孢子逐渐增多， 15h 便进入萌发高峰。萌发后的分生孢子或菌丝体在一定条件下可产生圆筒形、梨形或椭圆形的芽生孢子或圆筒形的节孢子，有的节孢子是由数个细胞构成的。在菌丝体内部也可形成圆球形或椭圆形的内生孢子，以单个或成串地发生，有时和节孢子相间发生。由此可见，白僵菌可通过分生孢子、芽生孢子、节孢子、内生孢子和菌丝体的断裂等多种方式进行无性生殖，生活史的类型属多孢型 (周燚