

绿僵菌的研究与应用

3476
0743

绿僵菌的研究与应用

郭好礼 傅仓生 李振兰 编著

中国农业科技出版社

内 容 提 要

本书介绍了绿僵菌的分类地位、病理学、菌剂生产、防治害虫的应用实例及研究进展，同时介绍了真菌鉴定的培养方法和电子显微镜观察真菌的制片方法。

这是迄今为止，我国第一本全面介绍绿僵菌知识的新书，可供从事真菌分类、生物防治工作的农林院校师生、综合大学生物系师生和农业技术推广者阅读参考。

绿僵菌的研究与应用

郭好礼 傅仓生 李振兰 编著

责任编辑 王涌清

封面设计 马 钢

中国农业科技出版社出版（北京海淀区白石桥路30号）
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售
河北省唐县印刷厂印刷

开本：787×1092毫米1/32 印张：2.875 字数：64千字

1990年12月第一版 1990年12月第一次印刷

印数：1—1000册 定价：1.60元

ISBN 7-80026-142-5/S·158

序

绿僵菌属是广谱虫生真菌，在生物防治中有重要应用价值。在国外，应用绿僵菌防治害虫的面积超过白僵菌，其防治效果也可与白僵菌媲美，研究的深度和广度都达到了相当可观的程度。特别是绿僵菌使用的安全性，其工作做的更加深入。在巴西、澳大利亚、美国、加拿大、墨西哥等国都已商业化生产绿僵菌剂，用于防治农林害虫。近年来，许多科学工作者研究发现，绿僵菌对建筑物害虫（白蚁）和卫生害虫（蚊子幼虫），乃至中药材冬虫夏草都有绿僵菌的栖生，在真菌代谢产物中，绿僵菌的代谢产物的医疗作用及机理也开始了研究。这在扩大绿僵菌应用于防疫、保健方面展现出广阔的前景。

在分类问题上，国外对绿僵菌属的分种数量记述很不一致，时而将此属分成几个种，时而将其他属的类似种也合并在此属二个种之中。这一时分时合现象的出现，其主要原因是由于对本属中各个种间的特征描述不够详尽和具体。作者对我国绿僵菌资源进行了收集，并对其培养特征和形态特征进行了系统研究。特别是采用扫描电镜观察分生孢子的微结构，为区别种间差异提供了科学依据。编制了本属各种的检索表，并命名了四个新种，给研究此属打下了基础。在本属的研究上比国外有所前进，有所创新，属国内先进水平，填补了国内同类研究的空白。为我国虫生真菌资源的调查研究和开发利用提供了科学依据。

作者在收集、鉴定、分类的基础上，综合了大部分国内

外文献资料，对僵病的病理学、僵病菌传播的有利条件、流行病理学、菌剂的生产技术、应用实例、防治害虫的潜在用途、安全性等问题做了介绍。本书还介绍了扫描电镜的制样方法和观察丝状真菌形态常用的方法，书后附有绿僵菌属部分种的电镜照片，可供从事丝状真菌分类研究者参考。

在我国应用绿僵菌防治害虫的报道很少，对绿僵菌的分类研究尚未见到系统报道。国内的几部著名的真菌著作（中国真菌总汇、中国的真菌、真菌鉴定手册），均未收入此属。这本书的出版，将给读者一份较为全面的绿僵菌研究和应用的资料。它将对我国利用绿僵菌防治害虫起到一定的推动作用。

我和郭好礼同志的认识，可追溯到他在中国农业科学院土壤肥料研究所主持农业微生物菌种保藏工作的时候，在将近10余年的过程中，形成了同行间先行者和后行者的一种默契合作关系。他经常来找我讨论一些业务上的问题。我见他为人诚恳，乐于好问并且尊重别人，就愿意将自己的看法无保留地告诉他，并提供我收集的绿僵菌菌种供他研究。论文的修改，拉丁文的描述都留下了我们合作的足迹。好礼同志谦恭好学，孜孜不倦及锲而不舍执着追求真理的精神，终有所成。本书的出版即是明证。故我乐以为序。

陈庆涛

1990年6月

前 言

在农业害虫的微生物防治措施中，白僵菌颇具盛名，绿僵菌却很少有人知道。其实，白僵菌、绿僵菌都是用它们的菌丝侵入虫体致死以后，长出白色分生孢子的真菌叫做白僵菌，长出绿色分生孢子的真菌叫做绿僵菌。“僵”这个字，就是“死亡而不腐烂”的意思。早在1879年，利用微生物消灭害虫的第一次实验就是利用绿僵菌感染奥国金龟子幼虫的方法进行的。后来，由于没有掌握它的生活规律，施用方法不当，防治害虫效果不很稳定，应用一直受到限制。近十几年来，许多国家科学工作者对绿僵菌的形态、分类、生理、生化、菌剂生产工艺和防治害虫的施用方法等问题进行了一系列研究，取得了可喜成果。实践证明，绿僵菌具有寄生昆虫范围广（8个目30科共约200余种和螨类）、无残毒，菌剂易生产、后效期长等特点。目前，在巴西、澳大利亚、墨西哥、美国、日本等国，均有商品菌剂生产。仅在巴西用于防治甘蔗和禾谷类同翅目沫蝉科害虫的面积，从1972年的500公顷发展到1978年的50000公顷。并准备利用绿僵菌防治几百万公顷草原区的沫蝉科害虫。在国外，应用面积和防治效果均可与白僵菌媲美。特别值得注意的是，绿僵菌对卫生害虫——蚊子幼虫具有特别有效的毒杀作用。国内外均在积极地对它进行深入研究。可见，绿僵菌是一种有应用前途的虫生真菌。

在巴西实际应用的同时，许多欧洲人经过深入研究找到

了一个分析的途径,开始获得有关病理活性方式、宿主防御反应和僵病流行病学方面的知识。总之,这些结果为绿僵菌防治害虫的实际应用开辟了美好的前景。

我国绿僵菌资源很丰富,在应用方面也取得良好效果。开展绿僵菌的研究和应用,具有重要意义。

绿僵菌属的分类是一个相当复杂的问题。以前较重视其形态和产孢结构特征。看来这并不能令人完全满意,许多科学工作者拟用酯酶同工酶谱、分子遗传特点、rRNA的序列等方面来鉴别该属各菌株之间的亲缘关系。作者认为,形态和现代技术分析相结合来确定该属中种的数量较为合适。但上述文献少,我们的工作尚欠完善和系统。

编写时间仓促,水平有限,难免有欠缺和错误之处,希望读者批评指正。

编著者

1990年9月

目 录

序

前言

一、绿僵菌属的分类地位	(1)
二、绿僵菌属中种的特征描述	(5)
三、僵病的病理学	(26)
(一) 感染方式	(26)
(二) 僵病的传播	(29)
(三) 腐生发育	(29)
(四) 传播的有利条件	(30)
(五) 流行病理学	(31)
四、菌剂的生产	(33)
(一) 菌株筛选与特征描述	(33)
(二) 菌剂生产技术	(33)
(三) 产品质量检查	(37)
五、防治害虫的应用实例	(41)
(一) 巴西应用绿僵菌剂的情况	(41)
(二) 澳大利亚对绿僵菌的研究和应用	(43)
(三) 防治害虫的潜在用途	(45)
(四) 应用的安全性	(53)
六、有关绿僵菌研究的部分结果	(55)
(一) 不同碳源对生长和孢子形成的影响	(55)
(二) 检测土壤中绿僵菌总数的选择性培养基	(55)

一、绿僵菌属的分类地位

绿僵菌属 *Metarhizium*(Metsch.)Sorokin 是由 Sorokin(1883)根据 Metschnikoff 确定的金龟子虫霉 *Entomophthora anisopliae* Metsch. 转属而建立。随着科学的发展,观察真菌形态特征的技术和研究方法不断改进,对该属菌的研究更加深入。从事绿僵菌分类的不同研究者,由于研究的标本并非同一模式,在描述中其形态特征均有小的改动。随着研究样本的增加,其范围无形中就扩大了。鉴于原始描述过于简单,致使后人研究此属时出现许多不应有的争议。曾报道的绿僵菌属不同的种有, *Metarhizium anisopliae*, *M. album*, *M. brunneum*, *M. cicadium*, *M. flavoviride*, *M. anisopliae forma major*, *M. anisopliae forma oryctophagum*, *M. glutinosum*, Tulloch(1976)研究绿僵菌属时,曾把这8个种和其他属的10个近似种归为 *Metarhizium anisopliae*(Metsch.)Sorok., *var. anisopliae* 和 *Metarhizium anisopliae*(Metsch.)Sorok. *var. major*(Johnston)Tulloch 之中。Tulloch(1976)发表绿僵菌属之后, M. C. Rombach(1986)发现了 *Metarhizium flavoviride var. minus var. nov.* 新变种。M. C. Rombach(1987)发表了重新恢复 *M. album* 这一名称的文章。可见,仅以 Tulloch(1976)的二个种和一个变种是难以包括此属菌种的。特别是近年来科学的发展,现代化仪器的使用,提高了研究水平。应用扫描电镜

可以观察真菌分生孢子的微结构，用此来区分不同种具有方便、有效等特点。鉴于以上事实和适应目前科学进展需要，在原模式基础上，有必要对此属特征描述作进一步补充修订，以便使此属特征描述更加明确具体。这样做是符合植物命名规则中分类群特征和范围变更规定的（张永格，1983）。本属菌应同时具有下列五方面特征：（1）菌落初期白色，产孢子阶段呈不同程度绿色；（2）分生孢子梗单生或者聚集，呈分生孢子梗座；（3）分生孢子以粘液粘成平行排列的柱状孢子团块；（4）分生孢子长形至长椭圆形；（5）属于昆虫寄生菌。在此属菌分种问题上，仅以菌落颜色分种，以分生孢子大小来区分变种也是不尽完善的。应在以上五方面特征的异同上，做综合分析。特别是分生孢子的微结构应是定种的主要特征。本属特征描述修订后，对自然界本属的复杂类群的研究将起到新的推动作用。

绿僵菌属特征摘要：

菌落初期白色，茸状。产孢阶段菌落中间呈一丛丛具不同程度绿色的分生孢子堆。菌落颜色由绿色变灰绿直至黑色或保持其原来绿色，或者呈翡翠绿色。基质反面色泽呈淡褐色，少数菌种可呈赭色。分生孢子梗单生或聚集，呈分生孢子梗座，紧密排列，帚状分枝或轮生体。帚状枝层次不复杂，1~2层，其顶端分枝，末端为瓶状小梗，以向基式产生分生孢子。分生孢子单细胞，链状连接。分生孢子以粘液粘成平行排列的柱状孢子链柱，老培养体柱状孢子链柱溃散为菱形或其他不规则形状的分生孢子团块。分生孢子长形至长椭圆形，无色，成堆时呈淡绿色至橄榄绿色，形体一般较青霉属孢子为大。本属系昆虫寄生菌。本属隶属于半知菌亚门Deuteromycotina，丝孢菌纲 Hyphomycetes，瘤座孢目Tu-

berculariales, 瘤座孢科 Tuberculariaceae, 与漆斑菌属 *Myrothecium* 的区别在于形成粘聚的链状分生孢子柱。

模式种: 金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin

绿僵菌属已知种检索表

1. 菌落绿色, 橄榄绿色, 后期变黑色。…………… 2.
——菌落绿色, 暗绿, 灰绿或黄绿, 但始终不变黑色。
…………… 3.
2. 分生孢子团块牢固, 排列整齐。分生孢子长椭圆形, 一端稍细。分生孢子两端连接处的平顶斜度小。分生孢子大小为 $7.5 \sim 8 \times 3.1 \sim 3.8$ 微米……………
…………… 金龟子绿僵菌 *M. anisopliae*
——分生孢子团块牢固, 排列整齐。分生孢子长形, 一端稍细, 分生孢子大小为平均 $12.9 (\pm 1.7) \times 3.28 (\pm 0.64)$ 微米。……大孢绿僵菌 *M. majorosporae*
= (图版 *M. anisopliae* var *major* 14~15)
——分生孢子团块牢固, 排列不整齐。分生孢子长椭圆形。分生孢子两端连接处的平顶明显不在同一中心轴上。分生孢子大小为 $6.7 \sim 7.3 \times 3.0 \sim 3.4$ 微米……………
…………… 贵州绿僵菌 *M. guizhouense*
3. 菌落绿色至灰绿色。分生孢子团块大, 粗细大大超过20个并列的分生孢子以上, 排列整齐。分生孢子长椭圆形, 两端对称。分生孢子链的连接点基本上在同一中心轴上。分生孢子大小为 $5.5 \sim 7.0 \times 1.5 \sim 2.5$ 微米。……………
…………… 平沙绿僵菌 *M. pingshanense*

- 菌落灰黄绿色，最终呈淡灰橄榄色。分生孢子团块大，排列整齐，长椭圆形，大小为 $7\sim 9\times 4.5\sim 5.5$ 微米。……………黄绿绿僵菌 *M. flavoviride*
- 其特征描述同黄绿绿僵菌。分生孢子大小为 $4.5\sim 7\times 2\sim 3$ 微米……………黄绿绿僵菌小孢变种 *Metarhizium flavoviride* var. *minus* (图版16~18)
- 菌落鲜绿至暗绿，分生孢子团块很细，粗细仅由4~8个分生孢子并列组成。在同一个分生孢子梗上，开始产生小型分生孢子，大小为 5.4×2.7 微米，接着产生香蕉形的柱形分生孢子，大小为 $17.2\sim 19.7\times 2.5\sim 3.7$ 微米。……………柱孢绿僵菌 *M. cylindrospora*
- 菌落开始白色，产孢区始终保持翡翠绿色，分生孢子链连接较松散，团块不紧密。分生孢子长椭圆形，连接处呈坛口状，大小为 $4\sim 6\times 1.8\sim 2.4$ 微米……………翠绿绿僵菌 *M. iadini*

※未观察此菌种，暂保留其名称。

二、绿僵菌属中种的特征描述

作者从1982年至1986年从事绿僵菌属真菌的收集和鉴定工作。在分类和鉴定中,采用扫描电镜观察分生孢子的表面结构和孢子链的连接情况,获得较好结果。现将当时的研究成果汇总于后。

绿僵菌属 *Metarhizium* (Metsch.) Sorokin 是由 Sorokin (1883) 根据 Metsch. 确定的金龟子虫霉 *Entomophthora anisopliae* Metsch. 转属而建立,由于地区拼音的习惯原学名 *Metarrhizium* 中多了一个“r”。尽管 Thaxter 和 Giard (1888) 提出了取消多余的“r”的校正拼法,但原有的拼法仍然被广泛引用。Tulloch (1976) 研究此属时再次取消了多余的“r”,正名为 *Metarhizium*。由于拼音原因造成重复字母的情况,现在已在国际植物命名法规条款中有相应的规定。此属菌可在鞘翅目、同翅目等昆虫上寄生,寄生范围很广,是重要的微生物资源。关于本属种的数目及描述国外记述很不一致。除了模式种金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 外, Petch (1931)、(1935) 建立了白色绿僵菌 *M. album* Petch 和褐色绿僵菌 *M. brunneum* Petch, 但 Tulloch (1976) 认为前者是金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 的一个未成熟的标本,在同一文中也赞成 Latch (1965) 的结论,认为后者的产孢结构与金龟子绿僵菌并无差别。

国内对于本属真菌作为甘蔗金龟子生防用菌,最早由广

东省顺德甘蔗试验场进行过小区试验。此后，轻工业部甘蔗糖业科学研究所、广东省国营平沙华侨农场、贵州农科院等单位应用绿僵菌防治甘蔗金龟子、梨虎等所做的大面积试验，均取得一定的效果，但关于本属分类学的研究尚属缺少，国内几部著名真菌著作均未收入此属。

本属最主要的分类依据为分生孢子梗座和栅状分生孢子梗上平行聚集的分生孢子柱及带橄榄色或绿色卵形至长形分生孢子的存在。上述性状除了平行聚集的孢子柱及孢子成链的特性在漆斑属 (*Myrothecium*) 不具备外，其余特征在漆斑属中都具备了，故可认为绿僵菌属与漆斑属是亲缘非常密切的姊妹属，同归属瘤座孢科 (*Tuberculariaceae*) 内，因此，在进行属的分类时，必须首先对本属的基本性状有所认识。

关于分生孢子的大小是否是种间分类的依据也有不同认识。Johnston (1915) 提出 *Metarhizium anisopliae* 区分为长孢型 (*formamajos*) 和短孢型 (*forma mines*)。Friederichs (1920, 1930), Petch (1931) 也注意到并建议以长孢和短孢形式区分亚种和变种。Kamat, Patel 和 Dhand (1952) 发现分生孢子长短取决于不同的培养基，其结论支持了 Johnston (1915) 的论点，认为各形式之间的区别是生理因素所致。Ferron, Hurpin 和 Robert (1972) 对 *Metarhizium anisopliae* 8 个菌株的研究，在大米和马铃薯琼脂培养基上，蝗虫体和原培养基上的分生孢子的大小没有明显的差异。因而，Tulloch (1976) 将绿僵菌属分为金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 和黄绿绿僵菌 (*Metarhizium flavoviride*) 两个种，又将前者中分生孢子属于长孢型的成立一个大孢变种 *var. major* 的新组合，而将

短孢型的保留在金龟子变种 (var. *anisopliae*) 之内。Tulloch (1976) 把 *Entomophthora anisopliae* Metsch., *Isaria anisopliae* (Metsch.) Pettit, *Penicillium anisopliae* (Metsch.) Vuill., *Metarhizium anisopliae forma minor* Johnston, *Isaria destructor* Metsch., *Ospora destructor* (Metsch.) Delacroix, *Isaria anisopliae var. americana* Pettit, *Penicillium cicadinum* Hohn, *Metarhizium cicadinum* (Hohn) Petch, *Metarhizium album* Petch, *Metarhizium brunneum* Petch, *sporotrichum puranense* Marchionatto, *Beauveria paranensis* (Marchionatto) Gosswald 等14个种名作为 *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. var. *anisopliae* 的异名。Tulloch (1976) 认为, *Metarhizium anisopliae forma major* Johnston, *Metarhizium anisopliae forma oryctophagum* Friederichs 归为 *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. var. *major* (Johnston) Tulloch 中。他将胶粘绿僵菌 *Metarhizium glutinosum* Pope (1944) 作为疣孢漆斑菌 *Myrothecium verrucaria* 的异名, 并将其许多可疑种排除本属之外。

根据前面述及的本属的基本性状特征, 参考前人分类观点, 特别是应用扫描电镜进行分生孢子微结构观察的特征, 作为本属的分类依据, 将我们收集到的绿僵菌的菌株分为四个分类单元, 即金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* ACCC 30104, 平沙绿僵菌 *Metarhizium pingshaense* sp. nov. ACCC 30105, 柱孢绿僵菌 *Metarhizium cylindrospora* sp. nov. ACCC 30114 和贵州绿僵菌 *Metarhizium guizhouense* sp. nov. ACCC 30115。下面叙述

这四个分类单元的形态学特征。

(一) 菌种及其来源

1. ACCC 30104

中国轻工业部甘蔗糖业科学研究所提供。此菌分离于致病黑色蔗龟(*Alissonotum* sp.)幼虫体。

2. ACCC 30105

广东省国营平沙华侨农场农科所提供,分离于自然死亡的黑色蔗龟幼虫体。

3. ACCC 30114

中国科学院微生物研究所提供,分离于茶树根部土壤中一种害虫幼虫。原号6008。

4. ACCC 30115

贵州农学院微生物教研组提供,分离于一种蝙蝠蛾(*Hepialus* sp.)幼虫体。原号2902。

(二) 方 法

1. 观察用培养基及培养温度 (1)马铃薯、葡萄糖、琼脂;(2)马铃薯、蔗糖、琼脂;(3)马铃薯、蔗糖、蛋白胨、琼脂。培养温度24~26℃。定时观察生长速度和菌落颜色变化。

2. 观察和测量方法 载片培养法,观察菌丝和分生孢子的着生状态;印片法,观察分生孢子的团块结构。用显微镜测微尺和扫描电镜照片相结合测量分生孢子的大小。

3. 扫描电镜观察分生孢子的超微结构 将生长丰满并出现分生孢子的斜面试管,置室内保存至干燥。挑取干菌块,用导电胶固定在样品台上,真空喷镀金,扫描电镜观察并拍照,将生长丰满并出现分生孢子的斜面,用刀片切成3.平方毫米的小块,用戊二醛、锇酸固定,乙醇脱水,然后