

S763.42

5

白僵菌对马尾松毛虫 致病机制及实验生态学的研究

湖南省林业科学研究所

彭建文 龙凤芝 杜克辉

一九八五年十月

一、前 言

二、研究方法

(一)、白僵菌感染松毛虫致病机制研究

1、养虫方式

2、喷菌方式

3、石腊切片

4、体液涂片

5、虫粪检查

(二)、白僵菌实验生态学研究

1、定温定湿控制

2、孢子萌发

3、菌丝生长及分生孢子产生时间

4、产孢量测定

5、致病力测定

三、研究结果

(一)、白僵菌感染马尾松毛虫的致病机制

1、白僵菌侵染途径

2、白僵菌在虫体上生长发育过程

(1)、体壁侵染

(2)、消化道侵染

3、感病松毛虫组织病理变化

(二)、白僵菌实验生态

1、实验温湿度对白僵菌孢子萌发生长影响

(1)、实验温度对孢子萌发生长影响

(2)、高温对白僵菌萌发生长影响

(3)、实验湿度对孢子萌发生长影响

(4)、实验温湿度对孢子萌发的综合影响

(5)、变温下孢子萌发试验

2、实验温湿度对白僵菌致病力影响

(1)、实验温度对致病力影响

(2)、实验湿度对致病力影响

(3)、温湿度对松毛虫致病力综合影响

(4)、室内变温变湿下杀虫试验

3、光对白僵菌的影响

(1)、白僵菌生长对光的需求

(2). 直射阳光对白僵菌孢子萌发影响

(3). 不同光源处理对白僵菌孢子影响

四、小 结

附件:

1. 白僵菌生物学特性的研究。

2. 白僵菌林间防治马尾松毛虫试验。

1912年我国历史上虽有过太湖蚕农利用僵死蚕尸捣碎泡水防治桑蚕的记载,但真正研究应用白僵菌防治害虫,还是从1954年以后才逐步开始的。在田间应用白僵菌防治大豆食心虫,甘薯象甲、玉米螟、稻叶蝉、松毛虫、木麻黄毒蛾、桔干象、桔红毒蛾农林害虫均获得了良好的效果。特别是七十年代以来,应用白僵菌防治松毛虫,在我国已成为一种主要手段,年防治面积达八百万亩以上。

应用白僵菌防治松毛虫的研究,在菌剂生产,防治害虫效果等方面,有过不少报导。但对马尾松毛虫的致病机制及相关生态学方面的问题,目前尚少见。为了充分发挥白僵菌长期控制马尾松毛虫的作用,1983年至1985年,我们承担了“六五”国家攻关课题“松毛虫综合防治”中有关白僵菌对马尾松毛虫实验生态学等

白僵菌对马尾松毛虫致病机制及

实验生态学的研究

一、前言

白僵菌 (*Beauveria bassiana* Vuill) 是昆虫的重要病原菌之一, 其寄主范围广泛。利用白僵菌防治农林害虫, 国内外均有不少报导。

1912年我国历史上虽有过太湖蚕农利用僵死蚕尸捣碎泡水防治桑螟的记载, 但真正研究应用白僵菌防治害虫, 还是从1954年以后才逐步开始的。在田间应用白僵菌防治大豆食心虫, 甘薯象甲、玉米螟、稻叶蝉、松毛虫、木麻黄毒蛾、^加柞干象、蝙蝠蛾等农林害虫均获得了良好的效果。特别是七十年代以来, 应用白僵菌防治松毛虫, 在我国已成为一种主要手段, 年防治面积达八百万亩以上。

应用白僵菌防治松毛虫的研究, 在菌剂生产, 防治害虫效果等方面, 有过不少报导。但对马尾松毛虫的致病机制及相关生态学方面的问题, 目前尚少见。为了充分发挥白僵菌长期控制马尾松毛虫的作用, 1983年至1985年, 我们承担了“六五”国家攻关课题“松毛虫综合防治”中有关白僵菌对马尾松毛虫实验生态学等

一系列问题的研究。现将试验研究成果报告如下：

二、研究方法

本试验所用白僵菌菌种，均为本所从致病松毛虫虫尸中分离所得。

（一）、白僵菌感染松毛虫致病机制研究：

1. 养虫方式：用 9×10 cm的玻璃养虫缸套上铁纱罩，反扣在装有硝酸钾饱和溶液的培养皿上制成保湿器，保持95——90%的相对湿度，放在 28°C 的恒温箱内饲养松毛虫。

2. 喷菌方式：体壁感染，选取健壮松毛虫幼虫用已配制好每毫升为50亿的孢子悬液，连续沾取三次凉干后，放入养虫缸内（松针不沾菌液）每养虫缸养虫15条；消化道感染，将松针放入与上相同的菌悬液内，沾取三次（松毛虫不沾菌液），凉干后，放入养虫缸内，每缸养虫1条，带菌松针5根；另设清水对照。

3. 石蜡切片：将已感菌的松毛虫，每隔8小时用波氏液固定。每次取幼虫2条，剪除头、尾、足末端坚硬部分及体壁长毛，按幼虫体节，切作10段，取其中第1——2胸节，第5、7、8腹节4段，分别埋蜡切片，切片厚度为5——8微米。用钼明矾——苏木精——伊红染色，制成永久切片。

4. 体液涂片：将感菌的松毛虫，每隔 24 小时，取其体液涂片，观察感菌后的变化。

5. 虫粪检查：喷菌后，每隔 24 小时，取虫粪检查：

(二)、白僵菌实验生态研究：

1. 定温湿度控制：

控制湿度：用 9×10 cm 的玻璃养虫缸套上铁纱罩，反扣在培养皿上制成保湿器，选取不同饱和盐类在培养皿内使保湿器分别保持 7 种相对湿度（见下表）。

饱和盐	蒸馏水	硝酸钾	氯化钾	碳酸钠	氯化钠	硝酸钙	无水氯化钙
相对湿度	100%	95%	85%	80%	75%	55%	35%

控制温度：用温箱、冰箱分别调至 0°C 、 5°C 、 10°C 、 15°C 、 20°C 、 24°C 、 28°C 、 30°C 、 32°C 、 35°C 、 39°C 十种不同的温度。

2. 孢子萌发：

控温孢子萌发：用常规悬滴法。

控湿孢子萌发：用培养液涂片法：将孢子接种在培养液内，振荡后吸一滴在玻片上涂匀凉干，架在 U 形玻棒上，放入用饱和盐类控制好相对湿度的双重培养皿的保湿器内，置一定温度下，12 小时后开始定时取片镜检。

3. 菌丝生长及分生孢子产生时间：

采用常规载片培养。24 小时后每天定时镜检。

4. 产孢子量测定:

取直径为 9 Cm 的培养皿, 灭菌后、滴入每毫升含 2.5×10^4 个孢子悬液, 倒入冷却未凝固的培养基 15 ml, 每个处理 5 个培养皿, 分别在不同定温下培养 20 天后, 将孢子用 1000ml 洗衣粉水冲洗至三角并, 振荡、用血球计数板记数。取其 5 个培养皿平均每小格孢子数的平均值。

5. 致病力测定:

选取健壮的松毛虫幼虫喷射每毫升 1 亿的孢子悬液, 置于用不同同饱和盐类控制的定湿器内饲养, 每次处理 2—3 个重复, 每出养虫 15—20 条, 空白对照, 每天检查统计一次。

三、研究结果

(一)、白僵菌感染马尾松毛的致病机制。

白僵菌感染马尾松毛虫致病机制的研究, 我们于 1973 年曾开展了“感染白僵菌的松毛虫病变初步观察”。在此基础上, 1983 ~ 1985 年进一步作了切片观察”, 以研究白僵菌对松毛虫的侵染过程及虫体的病理变化, 结果如下:

1. 白僵菌侵染途径:

试验表明, 白僵菌感染马尾松毛虫有两个途径; 一是通过体壁侵染, 二是通过消化道侵染, 其中体壁侵染最为普遍, 但湿度偏低

的情况下消化道侵染较多。

体壁侵染：分生孢子在松毛虫体表吸收其水份而萌发长出芽管。由芽管顶端分泌出溶几丁酶，使病虫体上几丁质溶解，芽管便不断生长进入体壁。当生长到达上皮细胞处，才发育成菌丝，在体壁下形成菌落，产生出大量芽生孢子，又不断萌发生长出新的菌丝，如此反复增殖而深入到体腔内部。（见图 1·2）

消化道侵染：松毛虫取食了带菌松针，将白僵菌孢子带入消化道。孢子在肠腔内萌发，产生芽生孢子和菌丝，而后穿过肠壁进入体腔。（见图 3、4）

2. 白僵菌在虫体上的生长发育过程：

定温为 28°C 、定湿为 95% 的条件下，白僵菌在松毛虫体上的生长发育过程，通过组织解剖，表述如下：

(1)、体壁侵染途径：

侵入萌发期：感菌 24 小时以后，白僵菌分生孢子便在松毛虫体壁上吸水萌发，伸出芽管穿过体壁。

芽生孢子期：多见于感菌五天后，白僵菌菌丝在皮下以芽生方式产生大量的芽生孢子。初期产生的为椭圆形芽生孢子。有的菌丝被松毛虫血细胞团团围住。这期间以繁殖芽生孢子为主，少数为节生孢子。松毛虫取食正常，血液内保卫细胞增多，其它组织正常。此期松毛虫感病而不减食。病虫死亡率为 10、8%。

多孢子形成期：多见于感菌第六天后，由于松毛虫体腔内菌丝和芽生孢子增多，均已集结于各组织四周，部分菌丝已开始侵入体壁几个丁质侵入此时已产出大量的芽生孢子、节孢子、内生孢子及厚垣孢子。这期间大部份感菌松毛虫取食停止，血液混浊，内有园筒形的芽生孢子；肌肉脂肪体开始解体，失去了明显的细胞界线；腹神经索、绢丝腺及马氏管等也开始被侵染；大量菌丝、孢子进入肠腔，肠壁细胞消失。但气管内仍无菌丝。病虫死亡率为37.8%。

分生孢子期：多见于八天后，松毛虫取食停止，虫体瘫痪或僵化，体内菌丝大增，组织全被破坏，成束的菌丝穿出体外，产生分生孢子梗和分生孢子。死亡率为78.3%。

(2)、消化道侵染途径：

入侵萌发期：感菌四天内，松毛虫取食正常、血液正常，排出的虫粪内，可见到孢子吸水萌发，解剖肠上皮细胞有已萌发孢子。

芽生孢子期：多见于第五天，松毛虫停止取食血液混浊，有芽生孢子，肠上皮基底膜褶曲处的体腔部位，有孢子与菌丝，被血细胞所包围；排出的虫粪内，可见到短菌丝及芽生孢子。

多孢子形成期：感菌六天后，在肠上皮褶曲处与足附近的体腔部位，菌丝与孢子进一步增多并已产生芽生孢子、节孢子、内生孢子、厚垣孢子等多种孢子。

分生孢子期，感菌八天后，白僵菌已侵入虫体体腔内各组织，

使各组织间界限不清，菌丝成束的穿出体壁，形成分生孢子梗及分生孢子。

3、感病松毛虫组织病理变化：

松毛虫感菌后，由体壁侵染的白僵菌，首先使松毛虫体壁和血液发生病变；而由消化道侵染的白僵菌则由肠壁穿入体腔引起病变。

(1)、分生孢子在松毛虫体表吸水萌发，生出芽管，而后穿过体壁进入体腔。在侵入体内各组织器官时，不仅使被破坏的细胞失去生命活力，即使是邻近的细胞，也要受到影响，例如邻近细胞中出现大型液泡，着色力降低，呈现病变反映。在此病变初期，白僵菌主要是破坏松毛虫体壁几丁质和皮下细胞。

(2)、分生孢子被松毛虫取食带入消化道，在消化道内萌发，长成菌丝，再穿过肠壁细胞，向体腔内侵入扩展。开始是靠近肠上皮基底膜褶曲处的体腔部位，血细胞增多，继之血细胞也被侵染，体液变得混浊。随后孢子减少，菌丝增多，由体腔侵入到各组织器官。在此病变初期，主要破坏肠上皮细胞。

(3)、白僵菌菌丝通过上述两个途径侵入松毛虫体腔内之后，首先都是血细胞增多，将菌丝团团包围，这是血细胞在行使吞噬作用，是虫体的一种保护反应。然后随着芽生孢子的不断繁殖，数量增多，血细胞很快失败，菌丝侵入血细胞内，反成为孢子与菌丝的养料，体腔液便出现混浊状态。而且节孢子萌发时，产生大量卵孢

~7~

毒素，使体液呈血红色，故而感病初死的松毛虫，腹部体表也显现出红色。

(4)、当孢子和菌丝发展到一定数量之后，孢子逐渐减少，菌丝逐渐增多，菌丝由体腔分别进入虫体的脂肪体、消化道、马氏管、神经节及气管等组织器官，使其细胞破坏而导致虫体死亡。

(二)、白僵菌实验生态：

温湿度是影响白僵菌生存，生长、发育及其与其它生物相互关系的关健因子，因此最适温、湿度的研究是白僵菌生态学研究的基础，我们在进行白僵菌实验生态学的研究中，将温湿度做为主要因子，在室内人为控制下将其对白僵菌的生长、发育及对松毛虫的致病的影响通过三年来反复试验，取得白僵菌萌发、生长及致病的最低，最高及最适温、湿度、为实际应用提供比较可靠的依据。

1、实验温湿度对白僵菌孢子萌发生长影响：

(1)、不同实验温度对孢子萌发生长影响：

实验是用涂片法及悬滴法进行，为尽量避免其它因素干扰，我们每次试验都是用同一菌株繁殖的三代种，并配成定量的培养悬液(1×10^6 孢子 / ml)，滴一小滴在玻片上涂均或制成悬滴培养。实验中除 $0^\circ - 10^\circ\text{C}$ 控温较困难，仅重复 4 次外，其它各温度均

有7—12次重复。现将历次试验中有孢子萌发的7次平均萌发率综合统计列表于下。

表1 不同温度下涂片试验孢子萌发比较表 1984—1985年

温度 萌发率	39℃	35℃	32℃	28℃	24℃	20℃	15℃	10℃	5℃	0℃
平均萌发率	0	38.3	69.6	83.1	81.6	70.2	57.0	40.4	4.3	0
最低萌发率	0	0	54.3	60.3	57.5	45.2	5.0	4.0	2	0
最高萌发率	0	60.4	83.3	93.1	93.8	89.3	76.6	71.5	6	0
最高萌发所需时间		34小时	48小时	36小时	36小时	48小时	120小时	192小时	240小时	0
48小时平均萌发率		22.6	67.1	83.1	79.4	48.2	3.7	0	0	

从表1中明显看出孢子萌发的最适温度为24—28℃，此温度范围内平均萌发率达80%以上，36小时最高萌发率达到90%以上。28℃最低萌发率60.3%，24℃最低萌发率57.5%。随着温度升高或降低萌发率也降低，速度减慢。35℃高温萌发率显著降低，最高一次萌发率只有60.4%，实验中常出现只个别孢子萌发或无孢子萌发。20℃低温时明显影响萌发速度，48小时平均萌发率48.2%，最高萌发率89.3%，实验中也出现过90%以上萌发率，但所需时间更长。10℃培养192小时

萌发率仍有71.5%。涂片法如果湿度控制不好。往往影响萌发率。因此我们又进行了4次悬滴孢子萌芽及载片培养。其中1次失败。其它3次10°—32℃萌发率都在90%以上。但萌发速度有显著差别。如表2:

从表2与表1同样看出一个规律, 24°—28℃萌发率高, 速^{92.7-93.1%}度快, 24小时萌发率^{92.7-93.1%}达93%以上, 生长发育整齐, 载片培养观察40小时开始产生孢子, 2次共10个培养皿平均产孢量最高, 稀释1千倍的菌液血球计数板计数平均每小格有孢子28℃为71.6、32.5个; 24℃为64.6、35.6个, 32℃萌发速度稍慢, 产孢^下降。35℃高温萌发, 生长都受到抵制, 载片培养观察: 菌丝弯曲、变形, 往往产生大量不育菌丝, 发育不整齐, 6天才产生分生孢子, 培养皿培养菌苔薄, 菌丝稀疏, 易被杂菌污染, 产孢量很低。低温10—15℃经长时间3—4天培养萌发率也可达90%以上, 但生长缓慢, 7天才产生分生孢子。5℃孢子很少萌发, 芽管不能伸长, 生长、发育停止。39℃及0℃孢子完全不能萌发。

《2》高温对白僵菌萌发生长影响:

据有关资料记载白僵菌孢子在超过40℃时很容易死亡, 我们的试验从45℃开始至100℃。用干热处理, 每种温度均重复2—3次。结果证明白僵菌孢子萌发, 随着温度的升高和处理时间的延长而逐渐降低。从表3看出45—50℃2小时萌发率不到60%

表2 不同温度下悬滴孢子萌发及产孢比较表

1984—1985年

56670

温度℃	试验次数			其中第二次试验萌发时间 小时										孢子开始产生时间	平均产孢量	
	1	2	3	16	24	40	48	72	88	112	136	144	166		1	2
39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
35	63.2	72.5	14.8	0	0	0	1	6	14.8	45.2	61.7	72.5		144		2.0
32	98	93.6	96.8	0	1	78.5	93.6							72	8.4	5.6
28	100	92.7	100	80.5	92.7									40	71.6	32.5
24	99.7	93.1	98	47.1	93.1									40	64.6	35.6
20		91.7	92.1	31.1	73.4	91.7								48	55.8	23.6
15		97.0		0	22.3	45.2	54.0	97.0						160		18.9
10	53.7	93.7	98	0	0	5	12.6	70.3	93.7					160		3.8
5		19.3	22.4	0	0	0	0	1	1		4	4.8	19.3	0		0
0	0	0	0													

~1h

表3 高温对白僵菌孢子萌发,产孢影响表 1985年

处理 温度 时间	45℃		50℃		60℃		70℃		80℃		90℃		100℃	
	萌发%	产孢量	萌发%	产孢量	萌发%	产孢量	萌发%	产孢量	萌发%	产孢量	萌发%	产孢量	萌发%	产孢量
2分													69.8	22.9
5分											71.2	15.8	37.7	22.4
10分									84.7	36.4			14.8	33.1
15分	94.5		91.3	20.7	90.8		42.7	44.5	50.8	34.8	62.4	20.3	8.4	25.0
30分	92.5	10.4	92.7	19.1	84.5	20.8	40.0	46.2	36.7	23.5	20.0	30.6	1.0	9.5
1小时	82.2	16.8	85.5	19.5	72.0	17.1	21.2	34.9	20.5	32.7	3.9	21.3		
2小时	57.9	14.0	51.6	43.6	41.2	18.5	10.0	22.5	12.4	25.3	1.0	12.1		
3小时	46.2	15.6	17.5	25.2	19.5	22.7			11.7	13.4				
4小时	43.6	16.4			9.4	28.7								
5小时	29.6				6.9	17.4								
对照	83.2	12.6	96.1	35.6	88.3	17.2	93.7	48.0	94	21.5	94	21.5	92.9	21.2

明显下降，3—5小时大部份不能萌发；60℃2小时萌发率只有41%，70—80℃15分钟萌发率仅剩50%左右。100℃5分钟仅剩60%活孢，10分钟大部份孢子死亡。

白僵菌在一定高温下大部份孢子死亡，但从表中可看出对产量影响不大，有些虽大部份孢子死亡，但产孢量却增加了。

(3)、实验湿度对孢子萌发生长影响：

为了摸清白僵菌孢子萌发较为准确的湿度我们在28℃的定温条件下，采用7组不同相对湿度做试验。结果证实白僵菌孢子萌发对湿度要求比较严格。从表4看出，在28℃定温条件下80%以上相对湿度能萌发。最适相对湿度为100%。用涂片法，8次平均萌发率为86.1%，最高为98%，最低为73.38%；悬滴法3次平均为97.5%，最高100%，最低为92.7%。

24小时悬滴比涂片高40%。随着湿度下降萌发率降低85%以下相对湿度经常无孢子萌发。相对湿度85%有3次无孢子萌发，平均只有17.8%；80%的湿度只有3次孢子萌发，平均只有3.7%；相对湿度75%、55%、35%虽在适宜的温度下孢子均不萌发。从表4中还可看出：湿度越小，萌发速度越慢，第5次试验同样48小时相对湿度85%比96%的萌发率低40%。

在24℃定温条件下，不同相对湿度对孢子萌发速度比较来看（表5）：湿度越大萌发率越高萌发越快，而且同样100%相对