

广东省斑蟊柱孢野村菌的分离鉴定与培养

贾春生¹, 甘俊², 刘发光¹, 黄阶华², 钟慧聪², 肖家亮², 马崇坚¹

(1. 韶关学院 英东生物工程学院, 广东 韶关 512005; 2. 广东始兴南山自然保护区, 广东 韶关 512521)

摘要:在广东省始兴南山自然保护区发现一种新的感染斑蟊(*Gaeana maculate*)成虫的昆虫病原真菌,经分离鉴定该真菌为柱孢野村菌(*Nomuraea cylindrospora*),是广东省新记录种。在室内进行温度对该菌孢子萌发、生长和产孢量的影响试验表明,该菌在 15~30℃均可萌发、生长和产孢,但最适温度均为 25℃。

关键词:柱孢野村菌; 分离; 鉴定; 培养; 温度; 广东始兴南山自然保护区

中图分类号:S763.15 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2013)-05-0128-04

Isolation, Identification and Cultivation of the *Nomuraea cylindrospora* on *Gaeana maculate* in Guangdong

JIA Chun-sheng¹, GAN Jun², LIU Fa-guang¹, HUANG Jie-hua², ZHONG Hui-cong²,
XIAO Jia-liang², MA Chong-jian¹

(1. Yingdong College of Bioengineering, Shaoguan University, Shaoguan, Guangdong 512005, China;

2. Nanshan Natural Reserve of Shixing in Guangdong, Shaoguan, Guangdong 512521, China)

Abstract: A new fungal pathogen infecting adults of *Gaeana maculate* was found during a survey of entomopathogenic fungi in Nanshan Natural Reserve of Shixing, Guangdong in 2011. The fungus was cultured *in vitro* and was identified as *Nomuraea cylindrospora*. This is the first report of *N. cylindrospora* infecting larvae of *G. maculate* in Guangdong. The effects of temperature on germination, radial growth and sporulation of the fungus were studied in the laboratory. The results showed that the optimum temperature for germination and mycelial growth was 25℃ though it could germinate, grow and sporulate at 15—30℃.

Key words: *Nomuraea cylindrospora*; isolation; identification; culture; temperature; Nanshan Natural Reserve of Shixing in Guangdong

S. S. Tzean^[1]等(1993)将柱孢绿僵菌(*Metarhizium cylindrospora*)重新组合为柱孢野村菌(*Nomuraea cylindrospora*),该菌寄生于台湾的台湾骚蟊(*Pomponia linearis*)^[1-2]。野村菌属(*Nomuraea*)目前包括 5 种真菌:莱氏野村菌(*N. rileyi*)、紫色野村菌(*N. atypicola*)、柱孢野村菌(*N. cylindrospora*)、绿色野村菌(*N. viridulus*)和 *N. anemonoides*,除最后 1 种腐生外,其余 4 种均为专性昆虫病原真菌,其中莱氏野村菌^[3]是世界广布种、

紫色野村菌^[4]次之,柱孢野村菌和绿色野村菌是世界稀有种,专性寄生于蟊,仅发现我国贵州省、台湾省和日本^[1-2,5-7]。近年,作者在广东省森林生态系统中先后发现了莱氏野村菌和紫色野村菌^[8-9]。2011 年 5 月在广东省南山省级自然保护区进行虫生真菌资源调查时,在树上采集到感染真菌死亡的斑蟊(*Gaeana maculate*)3 头,经室内分离鉴定该菌为柱孢野村菌(*N. cylindrospora*),是广东省新记录种,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本采集与分离鉴定

2011 年 5 月在始兴南山自然保护区采集到感染野村菌死亡的斑蟊 3 头,带回实验室保存于 4℃ 冰箱中,于 1 周内分离。取蟊体上的分生孢子在 SMAY 培养基(麦芽糖 40 g、蛋白胨 10 g、酵母粉 10 g、琼脂粉 20 g,水 1 000 mL 上,进行平板划线分离,采用史明欣^[10]等(2010)的方法进行纯化,分离成功后于液体石蜡中室温保存。依据 Tzean^[1](1993)的野村菌属(*Nomuraea*)检索表,进行真菌种类鉴定。

1.2 温度对柱孢野村菌孢子萌发率的影响

将灭菌的 SDAY 培养基倒入培养皿(6 cm)中制取平板,取孢子浓度为 1.0×10^6 conidia/mL 菌悬液 0.1 mL 接入到平板中,然后用玻璃涂布器涂布均匀,放入 25℃ 培养箱中进行培养,分别于 16、32 h 和 48 h 进行孢子萌发率观察,统计孢子萌发率。每次观察 100 个孢子,重复 3 次,孢子萌发以芽管长度超过孢子直径 1/2 为准。

1.3 温度对柱孢野村菌生长和产孢的影响

用移液枪吸取 1 mL 柱孢野村菌孢子悬浮液(浓度为 1.0×10^7 conida/mL),接种到 SDAY(葡萄糖 40 g,蛋白胨 10 g,酵母粉 10 g,琼脂 20 g,水

1 000 mL)平板中,然后用玻璃涂布器涂布均匀,放置于 25℃ 恒温箱中培养。8 d 后,当菌落均匀地长满培养基表面时,用直径为 0.5 cm 的打孔器打圆形菌片,将菌片菌面向下接种到新的 SDAY 平板(9 cm)中央,轻轻按压,使菌片与培养基完全接触,用封口膜封好后,倒置于 15℃、20℃、25℃ 和 30℃ 的恒温箱中培养,每个温度设 5 个重复。每隔 5 d 采用十字交叉法测量菌落生长直径,最后一次菌落生长直径测完后,用血球计数板计数在各温度下的产孢量。

利用 SPSS 17.0 软件对柱孢野村菌的孢子萌发率、菌落生长和产孢量进行单因素方差分析,采用 SNK 法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 蟊的感染症状

感染柱孢野村菌死亡的蟊,头部向上,以足紧紧附着于树干或树枝上,有时头胸部也紧贴于树干或树枝上。感染后期,于头部、胸及腹部的节间膜处形成粉状绿色子实体环带。由于腹部产生的子实体使蟊双翅较自然停息状态向两侧轻微张开,可见腹部背面的子实体。头胸部的孢子常较腹部先出现而且密集,显示感染可能是从头部开始(图 1)。



图 1 柱孢野村菌感染的斑蟊(左:背面观;右:腹面观)

Fig. 1 *Gaeana maculate* adults infected with *N. cylindrospora*



图 2 柱孢野村菌菌落

Fig. 2 A colony of *N. cylindrospora*

2.2 柱孢野村菌形态特征

在 SDAY 培养基上,菌落生长缓慢,菌落绿色,反面黄褐色(图 2)。菌丝体白色,由分枝、有隔、透明的菌丝组成,分生孢子梗大部分从气生菌丝伸出,偶尔从表面或基内菌丝伸出,有隔,顶端轮状着生小梗,常 1~5 个轮状着生于隔膜下方;小梗粗棒状或圆柱状,有时特别膨大;瓶梗 2 个或 8 个一组紧密排列(图 3)。分生孢子向基生长,呈链状着生,单细胞,壁光滑。分生孢子有 2 种类型:小型孢子和大型孢子,小型孢子先形成,卵形,椭圆形或亚球形, $5.6 \pm 1.2(4.2 \sim 7.5) \times 3.2 \pm 0.17(2.9 \sim 4.0) \mu\text{m}$;大

型孢子后形成,大多为圆柱形,椭圆形,通常稍弯曲, $12.43 \pm 1.4(10.45 \sim 19.6) \times 4.3 \pm 0.35(3.5 \sim 5.0) \mu\text{m}$,单个孢子透明至淡绿色,成堆时暗绿色(图 4)。根据该菌分生孢子梗顶端具有轮状着生小梗,小梗上部的瓶梗紧密围绕孢子梗横隔下排列,瓶梗轮生,宽圆柱形或有时基部膨大,分生孢子成堆时呈绿色的特征^[11],表明该菌属于野村菌属。在野村菌属现有的 5 个种中,寄生于蟊的只有柱孢野村菌和绿色野村菌 2 种^[1,7],其中只有柱孢野村菌具有两型孢子:大型孢子圆柱形 $(16.2 \sim 20.3 \times 3.5 \sim 5.0 \mu\text{m})$,小型孢子卵形 $(3.3 \sim 6.7 \times 3.3 \sim 4.2 \mu\text{m})$ ^[1]。

根据上文描述的寄生于斑蝉上的野村菌的分生孢子形态特征,该菌明显具有大小两型孢子,所以将该菌

鉴定为柱孢野村菌(*N. cylindrospora*)。

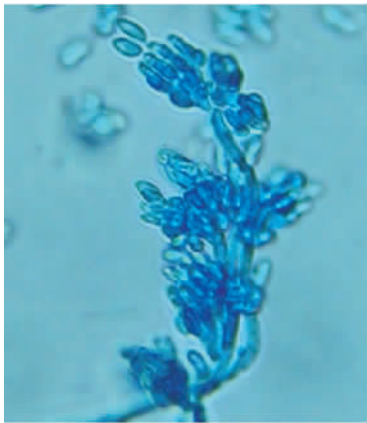


图 3 柱孢野村菌分生孢子梗(400×)
Fig. 3 Conidiophore of *N. cylindrospora*

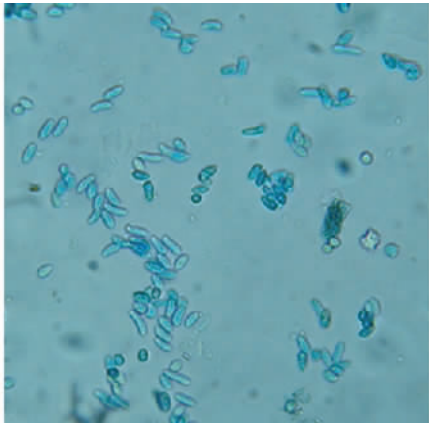


图 4 柱孢野村菌分生孢子(400×)
Fig. 4 Conidia of *N. cylindrospora*

2.3 温度对柱孢野村菌孢子萌发的影响

由表 1 可知,柱孢野村菌分生孢子在 15~30℃均可萌发,孢子萌发率先随着温度的升高而增加,到 25℃时萌发率达到最大,48 h 萌发率为 97.0%,而当温度增加到 30℃,萌发率显著下降,但仍显著高于 15℃和 20℃时的萌发率。在各温度下 3 个不同时间点(16、32 h 和 48 h)测得的萌发率显示,柱孢野村菌的萌发速度比较缓慢,16 h 时最高仅为 35.3%、32 h 为 78.6%、48 h 为 97.0%。

2.4 温度对柱孢野村菌生长的影响

由表 2 可知,柱孢野村菌在 15~30℃均可生长,生长速度先随着温度的升高而增加,25℃时生长

速度最快,而当温度增加到 30℃时,生长速度显著下降,并显著低于 20℃时的生长速度。在各温度下不同时间点测得的萌发率显示,柱孢野村菌的生长速度比较缓慢,26 d 时最高仅为 2.95 cm。

表 1 温度对柱孢野村菌孢子萌发的影响

Table 1 Effect of temperature on germination rate of *N. cylindrospora*

温度/℃	孢子萌发率/%		
	16 h	32 h	48 h
15	1.5±0.2d	10.7±2.6d	28.2±4.0d
20	16.8±0.9c	51.6±4.1c	75.6±7.3c
25	35.3±5.2a	78.6±10.4a	97.0±1.8a
30	25.2±1.1b	68.3±4.4b	87.2±3.4b

注:同一列数据间凡带相同的字母表示差异不显著($p<0.05$),表 2、表 3 同。

表 2 温度对柱孢野村菌生长的影响

Table 2 Effect of temperature on the colony growth of *N. cylindrospora*

温度/℃	菌落直径/cm					
	1 d	6 d	11 d	16 d	21 d	26 d
15	0.50±0.00a	0.56±0.04c	0.65±0.03d	0.81±0.04d	0.97±0.03d	1.23±0.03a
20	0.50±0.00a	0.87±0.06b	1.37±0.03b	1.77±0.02b	2.17±0.10b	2.56±0.03a
25	0.50±0.00a	1.09±0.08a	1.56±0.06a	1.92±0.01a	2.41±0.07a	2.95±0.10a
30	0.50±0.00a	0.65±0.04c	0.92±0.06c	1.18±0.04c	1.52±0.13c	1.77±0.13a

表 3 温度对柱孢野村菌产孢量的影响

Table 3 Effect of temperature on the sporulation of *N. cylindrospora*

产孢量 (1.0×10^8 conidia)	15℃	20℃	25℃	30℃
	0.01±0.00c	1.21±0.01b	4.70±0.10a	1.34±0.01b

2.5 温度对柱孢野村菌产孢量的影响

由表 3 可知,柱孢野村菌在 15~30℃均可产孢,产孢量先随着温度的升高而增加,到 25℃时产孢量达到最高,为 2.21×10^8 conidia,而当温度增加到 30℃时,产孢量显著下降,但与 20℃产孢量差异

不显著。

3 结论与讨论

根据 S. S. Tzean^[1]等(1993)给出的野村菌属(*Nomuraea*)真菌种的检索表,将采集于始兴南山自

然保护区感染斑蟊(*G. maculate*)的野村菌鉴定为柱孢野村菌(*N. cylindrospora*),是广东省新记录种。目前寄生蟊的野村菌有柱孢野村菌(*N. cylindrospora*)和绿色野村菌(*N. viridulus*),这 2 种真菌的主要区别是前者具有 2 种类型孢子(大型孢子和小型孢子),而后者只有 1 种类型孢子(只有大型孢子而无小型孢子)。始兴菌株的分生孢子明显具有大小 2 种类型孢子,所以将该菌鉴定为柱孢野村菌(*N. cylindrospora*)是正确的,但始兴菌株的大型孢子($12.43 \pm 1.4(10.45 \sim 19.6) \times 4.3 \pm 0.35(3.5 \sim 5.0) \mu\text{m}$ 略显小于台湾产的菌株($16.2 \sim 20.3 \times 3.5 \sim 5.0) \mu\text{m}$),这可能是两地寄主种类不同引起了分生孢子大小的变异(该菌在台湾感染台湾骚蟊(*Pomponia linearis*))。始兴南山自然保护区是否存在绿色野村菌(*N. viridulus*)还有待进一步调查。

由于柱孢野村菌比较罕见,目前国内外尚未见对该菌培养的报道。K·Manjula^[12]等(2005)报道,25℃时莱氏野村菌在 SDAY 培养基培养 10 d,菌落直径可达 60.17 mm,而柱孢野村菌培养 11 d 后菌落直径仅为 1.56 cm,生长速度明显较前者缓慢。但与台湾报道的另一种感染蟊的绿色野村菌相比^[13],两者萌发率、菌落生长速度和蟊孢量比较接近,表明两者生物学特性相近。

马占相思(*Acacia mangium*)适应性强,生长迅速,能固氮改良土壤,材质较好,是广东省荒山绿化的主要树种之一^[14]。但近年受斑蟊危害严重^[15],该菌的分离培养成功,可以为斑蟊的防治提供一种新的防治手段。

参考文献:

[1] TZEAN S S, CHEN J L, WU W J. *Nomuraea cylindrospora* comb. Nov. [J]. Mycologia, 1993, 85(3): 514-519.

[2] 郭好礼, 叶柏龄, 岳莹玉, 等. 绿僵菌属的三个新种[J]. 真菌学报, 1986, 5: 177-184.

GUO H L, YE B L, YUE Y Y, *et al.* Three new species of *Metarhizium* [J]. Acta Mycologica Sinica, 1986, 5(3): 177-184. (in Chinese)

[3] 蒋婧婧, 马忠友, 李佳丽, 等. 重要虫生真菌莱氏野村菌芽生孢子的形态发生[J]. 菌物学报, 2010, 29(3): 340-346.

JIANG J J, MA Z Y, LI J L, *et al.* Morphogenesis of blastospores of *Nomuraea rileyi*, an important entomogenous fungus [J]. Mycosystema, 2010, 29(3): 340-346. (in Chinese)

[4] 周娜, 陈名君, 黄勃, 等. 引起蜘蛛流行病的紫色野村菌种群异

质性[J]. 菌物学报, 2010, 29(1): 37-43.

ZHOU N, CHEN M J, HUANG B, *et al.* Population heterogeneity of *Nomuraea atypicola*, a causal pathogen in spider populations [J]. Mycosystema, 2010, 29(1): 37-43. (in Chinese)

[5] 刘爱英, 梁宗琦, 曹蕾. 双型孢绿僵菌的分离鉴定研究[J]. 贵州农学院学报, 1989(2): 27-31.

LIU AY, LIANG Z Z, CAO L. Isolation and identification of *Metarhizium biiformisporae* [J]. Journal of Guizhou Agricultural College. 1989(2): 27-31. (in Chinese)

[6] SHIMAZU M. *Metarhizium cylindrospora* Chen et Guo (Deuteromycotina: Hyphomycetes), the causative agent of all epizootic on *Graptopsaltria nigrofasciata* Motchulsky (Homoptera: Cicadidae) [J]. Applied Entomology and Zoology, 1989, 24: 430-434.

[7] TZEAN S S, HSIEH J L, CHEN J L, *et al.* *Nomuraea viridulus*, a new entomogenous fungus from Taiwan [J]. Mycologia, 1992, 84(5): 781-786.

[8] 贾春生, 刘发光. 车八岭国家级自然保护区森林昆虫病原真菌初报[J]. 西北林学院学报, 2010, 25(5): 108-111.

JIA C S, LIU F G. Preliminary investigation on the entomopathogenic fungi of forest insects in Chebaling National Nature Reserve [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2010, 25(5): 108-111. (in Chinese)

[9] 贾春生. 广东省森林昆虫病原真菌调查[J]. 西南林学院学报, 2010, 30(1): 51-54.

JIA C S. Preliminary report on forest entomopathogenic fungi in Guangdong province [J]. Journal of Southwest Forestry University, 2010, 30(1): 51-54. (in Chinese)

[10] 史明欣, 张曦, 宋晓斌. 板栗内生真菌的分离及其鉴定[J]. 西北林学院学报, 2010, 25(4): 115-119.

SHI M X, ZHANG X, SONG X B. Isolation and identification of endophytic fungi from *Castanea mollissima* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2010, 25(4): 115-119. (in Chinese)

[11] SAMSON R A. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes [J]. Studies in Mycology, 1974, 6: 1-119.

[12] MANJULA K, KRISHNA MURTHY K V M. Combined effect of *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson and insecticides against third instar larvae of *Spodoptera litura* Fab. [J]. Indian Journal of Plant Protection, 2005, 33(1): 141-142.

[13] 彭声仪, 简巧志, 萧文凤. 虫生真菌 *Nomuraea viridulus* 之生物学探讨[J]. 台湾昆虫, 2010, 30: 145-165.

PENG S Y, JIAN Q Z, XIAO W F. Biological characteristics of Entomopathogenic fungus, *Nomuraea viridulus* [J]. Formosan Entomology, 2010, 30: 145-165. (in Chinese)

[14] 任海, 彭少麟, 向言词. 鹤山马占相思人工林的生物量和净初级生产力[J]. 植物生态学报, 2000, 24(1): 18-21.

REN H, PENG S L, XIANG Y C. Biomass and netprimary productivity in an *Acacia mangium* plantation in Heshan, Guangdong, China [J]. Acta Phytocologica Sinica, 2000, 24(1): 18-21. (in Chinese)

[15] 童国建, 刘建锋, 丘国森, 等. 马占相思树斑点黑蟊观察研究初报[J]. 广东林业科技, 2005, 21(3): 54-58.