叶峻豪,何景超,魏燕华,等.1株白僵菌分离鉴定、生物学特性及对草地贪夜蛾幼虫影响[J].山西农业大学学报(自然科学版),2024,44(5):103-111.
Ye J H, He J C, Wei Y H, et al. Isolation, identification, biological characteristics, and insecticidal activity of a *Beauveria bassiana* strain against *Spodoptera frugiperda* larvae[J]. Journal of Shanxi Agricultural University(Natural Science Edition), 2024,44(5):103-111.
doi: 10.13842/j.cnki.issn1671-8151.202404062

1株白僵菌分离鉴定、生物学特性及对草地贪夜蛾幼虫影响

叶峻豪[1],何景超[1],魏燕华[1],欧光敏[1],张志祥[2],程东美[1*]

(1.仲恺农业工程学院 农业与生物学院,广东 广州 510225;2.华南农业大学 绿色农药国家重点实验室,广东 广州 510642)

摘　要:[目的]本研究旨在发掘对草地贪夜蛾幼虫高活性虫生真菌资源。[方法]本试验采用球孢白僵菌选择性培养基成功从土壤中分离纯化出一株白僵菌菌株(编号为QB10),以形态学和rDNA-ITS序列分析相结合进行了菌株鉴定,利用浸虫法测定了对草地贪夜蛾2龄幼虫的活性,并研究了其生物学特性。[结果]菌株QB10为球孢白僵菌*Beauveria bassiana*;菌株QB10对草地贪夜蛾幼虫具有较强的致病性,致病力与处理时间和孢子悬浮液浓度呈正相关;菌液处理后1、3、5、7和10 d,草地贪夜蛾2龄幼虫的致死中浓度(LC_{50})分别为18.87×10^{7}、4.98×10^{7}、0.63×10^{7}、0.29×10^{7}和0.19×10^{7} cfu•mL^{-1};孢子悬浮液浓度由1×10^{6} cfu•mL^{-1}提升至1×10^{8} cfu•mL^{-1}时,幼虫的半致死时间(LT_{50})由16.12 d降低至1.56 d。生物学特性方面,菌株QB10在温度为28 ℃、湿度为100%、pH值为6、全光照条件下的PPDA培养基上菌丝和产孢生长最佳;最适碳源为可溶性淀粉和麦芽糖,碳源为可溶性淀粉时,菌落直径和产孢量分别为3.93 cm和3.17×10^{6} cfu•mL^{-1},碳源为麦芽糖时,菌落直径和产孢量分别为3.70 cm、3.20×10^{6} cfu•mL^{-1};最适氮源为酵母提取粉和黄豆粉,氮源为酵母提取粉时,菌落直径和产孢量分别为3.75 cm和3.32×10^{6} cfu•mL^{-1},氮源为黄豆粉时,菌落直径和产孢量分别为3.63 cm和3.65×10^{6} cfu•mL^{-1};菌株在15 ℃至35 ℃内均可生长,40 ℃会导致菌株死亡;短时间(≤20 min)紫外线照射对菌丝生长无明显影响,对产孢有抑制作用。[结论]球孢白僵菌菌株QB10对草地贪夜蛾幼虫具有较强抑制作用,营养生长和产孢条件均有较好的适应性,可作为草地贪夜蛾防治的优良生防资源。

关键词:球孢白僵菌;鉴定;草地贪夜蛾;致病力;生物学特性
中图分类号:S476.12　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1671-8151(2024)05-0103-09

白僵菌(*Beauveria*)是一类寄主范围广、致病性与适应性很强的昆虫病原真菌,是农林害虫生物防治中应用最多的虫生真菌之一[1]。白僵菌对寄主的致病作用是通过自身孢子萌发,菌丝生长破坏并进入寄主皮层组织,逐渐在组织内扩展和扩繁,吸取寄主养分并不断产生和释放毒性物质,在获取菌株自身发育所需物质同时导致寄主死亡[2-4]。白僵菌感染导致的昆虫僵化病症极为常见,占比超过昆虫真菌病害的20%[5],成为备受瞩目的生防菌研究对象。白僵菌分类丰富多样,最为常见的是球孢白僵菌[6],具备出色的侵染能力,能够寄生超过700种昆虫,在生物防治领域占据着举足轻重的地位。

草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)是全球预警的跨国境重大迁飞性害虫,具繁殖快、寄主多、食量大、爆发性强[7]等特点,对多个国家玉米、水稻等作物生产造成了巨大损失[8-9]。自2019年1月入侵我国以来,迅速在全国扩散蔓延,目前已完全定殖[10-12]。研究表明,球孢白僵菌对草地贪夜蛾具有较好的室内活性和田间防效[13-16],是一种具有发展潜力的生防菌剂。但不同来源的菌株对不同害虫的致病力有明显差异,同一菌株的致病力还因营养条件和培养的环境因子等不同而产生差异,因此,获得对草地贪夜蛾具有高活性的白僵菌菌株

收稿日期:2024-04-23　　**修回日期**:2024-07-29
基金项目:广东省农业农村厅乡村振兴战略专项(2023KJ133);广东省教育厅基金(2022ZDJS020)
作者简介:叶峻豪(ORCID:0009-0007-6043-5355),硕士研究生,研究方向:植物保护,E-mail:1282785194@qq.com
*通信作者:程东美(ORCID:0000-0002-4638-0884),博士,副教授,E-mail:zkcdm@163.com

并明确其生物学特性,对草地贪夜蛾的生防菌剂的开发和应用具有重要意义。本研究从广州市花都区玉米地采集3份土壤样本分离获得1株虫生真菌,进行了形态学鉴定和ITS-rDNA序列分析,测试了对草地贪夜蛾2龄幼虫的致病性,并研究了其生物学特性,旨在为草地贪夜蛾生物防治提供菌种资源和发酵培养提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 土壤样品与供试昆虫

于2021年10月在广东省广州市花都区(23.411°N,113.227°E)玉米地,随机设立3个相距50 m的采样点。深挖10~20 cm土层,取颗粒状土壤样品各约100 g,确保土壤自然状态与颗粒结构完好。随后,3份样品均贴上标签,详细记录采样点编号、日期、土壤类型(颗粒状)及采集者信息。

草地贪夜蛾幼虫由华南农业大学天然农药与化学生物学教育部重点实验室提供。在室内孵化幼虫后以人工饲料饲养至化蛹,待羽化产卵后作为供试虫源。室内饲养条件为温度(28±1) ℃,相对湿度70%~90%,光周期L//D=16 h//8 h。

1.1.2 供试培养基配方

PDA:蔗糖和琼脂各20 g、马铃薯200 g、超纯水1000 mL。

SDAY:细菌学蛋白胨和酵母粉各10 g、琼脂20 g、蔗糖40 g、超纯水1000 mL。

Czapek[17]:蔗糖30 g、磷酸氢二钾1 g、硝酸钾3 g、氯化钾0.5 g、七水合磷酸镁0.5 g、琼脂20 g、超纯水1000 mL。

PPDA:马铃薯200 g、细菌学蛋白胨10 g、琼脂和葡萄糖各20 g、超纯水1000 mL。

SMAY:细菌学蛋白胨和酵母提取粉各10 g、琼脂20 g、麦芽糖40 g、超纯水1000 mL。

球孢白僵菌选择性培养配基(BBSSM)[18]:葡萄糖40 g、氯霉素0.5 g、琼脂15 g、再生蛋白胨10 g、硫酸铜1 g、放线菌酮0.5 g、孟加拉红0.33 g、超纯水1000 mL。

所有培养基在配制完成后,使用0.1 mol·L^{-1}的HCl或NaOH溶液调节pH至7.0。

1.2 试验方法

1.2.1 土壤虫生真菌的分离

去除土壤样品石块、根系等非土壤杂质,用橡皮锤将土壤样品拍打成粉状,通过40目筛筛选出约10 g细土。向细土中加入100 mL的0.1%吐温-80溶液,混合均匀后静置20 min。待不溶物沉降,用吸管吸取上清液加入10 mL的0.05%吐温溶液中摇匀,制得土壤悬浮液。取100 μL悬浮液涂布于球孢白僵菌选择性培养基(BBSSM)平板上,每个样品重复5次,(25±1) ℃培养7 d,观察菌落生长[19]。待平板上出现单菌落,无菌条件下用消毒接种针挑选菌丝接种至PDA培养基中,重复操作至菌种纯化。将纯化菌种接入PDA斜面培养基,冷藏于4 ℃冰箱中。从3份土壤样品中,成功分离并纯化出1株虫生真菌,编号为QB10。

1.2.2 菌株培养及形态观察

将纯化后的菌种以5 mm直径的菌饼接种于PDA和PPDA培养基,置于(25±1) ℃、24 h光照的恒温培养箱中培养,待观察到菌株产孢后,观察记录菌落特征和大小[20],以光学显微镜和扫描电镜观察菌丝、孢子和产孢结构。

1.2.3 菌株的分子鉴定

借助Chelex-100法来萃取DNA[21],通过震荡离心、水浴加热等步骤完成粗提。以提取的DNA为模板,加入特异引物及PCR混合物,进行PCR扩增。

PCR反应条件:94 ℃预变性3 min;94 ℃变性30 s;55 ℃退火30 s;72 ℃延伸40 s,并循环30次;72 ℃延伸10 min。

PCR完成后,将产物在含有1%琼脂糖凝胶的电泳槽中进行电泳检测,以确认目标DNA片段的成功扩增。随后,DNA样品由广州天一辉远基因科技有限公司进行测序。测序结果经编辑优化后,利用BLAST程序比对,并下载同源序列。最后,使用MEGA 7.0软件进行比对验证,构建系统发育树。

1.2.4 菌株对草地贪夜蛾幼虫的活性测定

将分离纯化后的菌种,在培养基上增殖至产孢,用含0.2%吐温-80无菌水配制成不同浓度(1×10^6、5×10^6、1×10^7、5×10^7、1×10^8 cfu·mL^{-1})的孢子悬浮液。处理组幼虫分别于不同浓度的孢子悬浮液中浸泡5~10 s后取出,对照组幼虫则经

0.05%吐温-80无菌水浸泡5～10 s后取出,接种至含饲料的六孔板,每个处理选20只健康的草地贪夜蛾2龄幼虫进行处理,每个处理3次重复,置于恒温培养箱(25 ℃,24 L//0 D,相对湿度为90%)中培养。试验期间,每天为试虫提供新鲜饲料,以确保其营养充足。处理后第2～10 d观察并记录死虫数,计算死亡率、校正死亡率、致死中浓度(LC_{50})和致死中时(LT_{50})。

1.2.5　菌株的生物学特性研究

本试验设置8种处理(培养基、温度、湿度、光周期、pH、碳源、氮源、紫外线照射),每种处理3次重复。培养7 d后,用十字交叉法测量各处理菌落直径,14 d后,向各处理加入0.05%吐温-80无菌水将孢子洗下,3层纱布过滤后,在生物显微镜下用血球计数板测定孢子数量。

培养基处理:选用了PDA、PPDA、SDAY、SMAY、Czapek 5种培养基配方,配方详见本文1.1.2。制备平板后接种直径为5 mm的QB10菌丝块,每个处理3次重复。在温度25 ℃、湿度90%、黑暗环境的恒温培养箱内培养。

温度处理:在PPDA培养基上,接种直径为5 mm的QB10菌丝块,分别置于不同温度(15、20、25、28、30、35、40 ℃)的恒温培养箱(湿度为90%、黑暗环境)内培养。

湿度处理:将直径为5 mm的QB10菌丝块接种于PPDA培养基,分别置于不同湿度(65%、75%、85%、90%、95%和100%)的恒温培养箱(温度25 ℃、黑暗环境)内培养。

光周期处理:将直径为5 mm的QB10菌丝块接种于PPDA培养基,分别置于不同光周期(24 L//0 D、0 L//24 D、12 L//12 D)的恒温培养箱(温度25 ℃、湿度90%)内培养。

pH处理:配置0.1 mol·L^{-1}的HCl和NaOH溶液,调节PPDA培养基pH为3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0和11.0,置于温度25 ℃、湿度90%、黑暗环境的恒温培养箱内培养。

碳源处理:基于Czapek培养基(蔗糖30 g、磷酸氢二钾1 g、硝酸钾3 g、氯化钾0.5 g、七水合磷酸镁0.5 g、琼脂20 g、超纯水1000 mL),选用葡萄糖、乳糖、麦芽糖、纤维素、可溶性淀粉、玉米粉、果糖、棉子糖等8种材料作为测试碳源,替换Czapek培养基中的蔗糖,并设置无碳源对照组。将QB10菌丝块接种于不同碳源培养基上,置于温度25 ℃、湿度90%、黑暗环境的恒温培养箱内培养。

氮源处理:基于Czapek培养基(蔗糖30 g、磷酸氢二钾1 g、硝酸钾3 g、氯化钾0.5 g、七水合磷酸镁0.5 g、琼脂20 g、超纯水1000 mL),选用牛肉浸膏、酵母提取粉、蛋白胨、硫酸铵、黄豆粉、麦麸、氯化铵7种材料作为测试氮源,替换Czapek培养基中的硝酸钾,并设置无氮源对照组。将QB10菌丝块接种于不同氮源培养基上,置于温度25 ℃、湿度90%、黑暗环境的恒温培养箱内培养。

紫外线照射处理:将QB10菌丝块接种于PPDA培养基,置于紫外灯管下约25 cm处照射0、5、10、15、20、30 min后放入恒温培养箱(温度25 ℃、湿度90%、黑暗环境)内培养。

1.2.6　数据分析

试验数据经Excel 2021整理后,采用SPSS 26.0统计分析软件选用邓肯氏新复极差(DMRT)法对试验数据进行显著差异性分析。

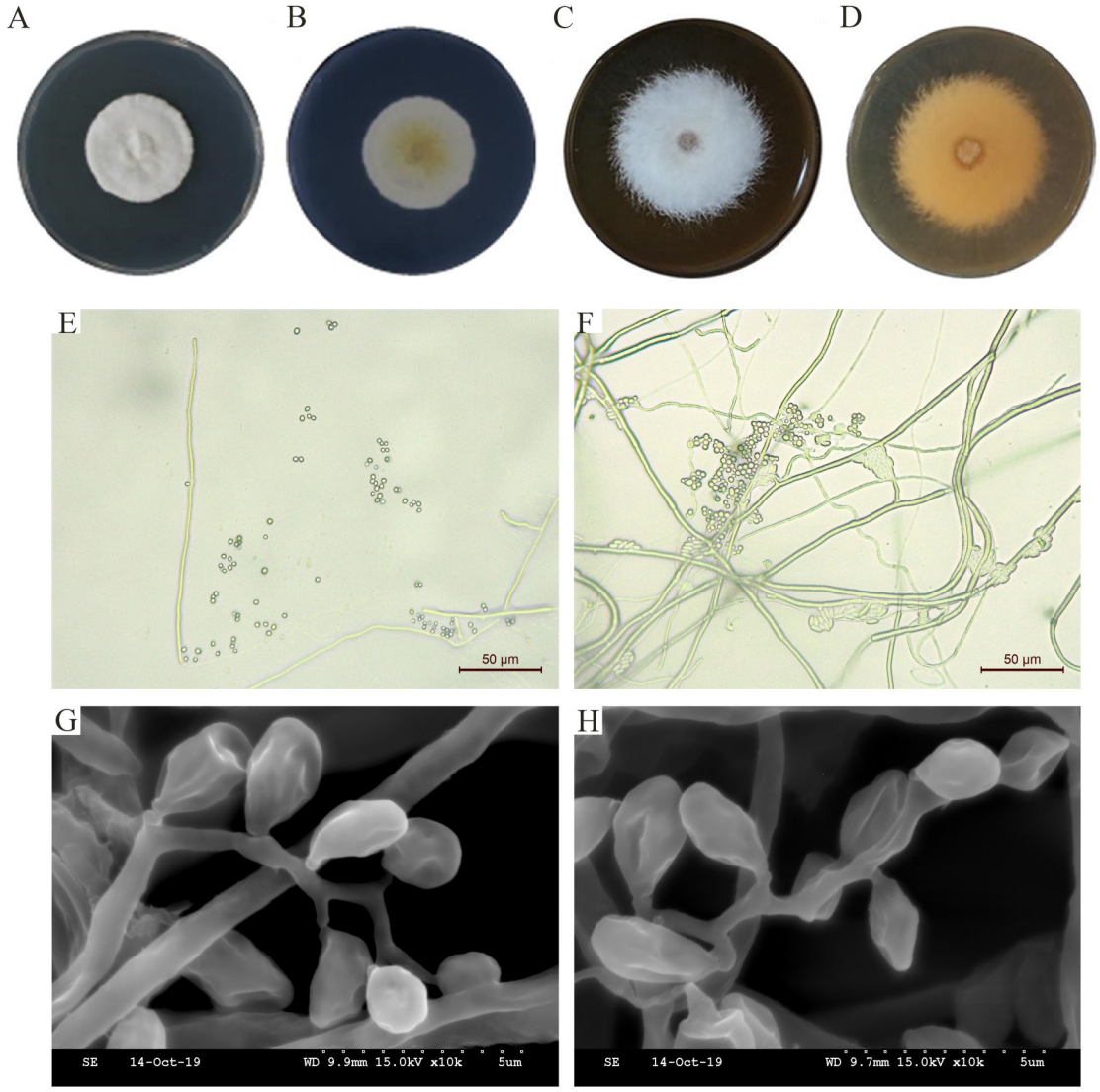
2　结果与分析

2.1　菌株的形态特征

以球孢白僵菌选择性培养基(BBSSM)从采集的土壤样本中成功分离纯化白僵菌菌株,命名为QB10。经显微形态初步鉴定,确认该菌株为白僵菌。菌株QB10在PDA和PPDA 2种培养基中均生长良好,在PPDA培养基中生长较快,菌落直径较大。在PDA培养基上,菌落正面菌丝呈绵状,中间突起,菌落平整,背面1/2处呈淡黄色,边缘为乳白色,培养10 d的菌落平均直径为3.95 cm(图1A-图1B)。在PPDA培养基上,菌落菌丝浓密呈絮状,清晰可见,边缘呈锯齿形,菌落正面乳白色,背面大面积淡黄色,菌落平均直径为4.85 cm,菌落外缘菌丝清晰,背面菌丝呈绒毛状(图1C-图1D)。显微观察可见产孢结构呈“之”,分叉生长,分枝顶端有多个圆形小梗,分生孢子呈串联簇状圆形,大小直径为1.67～2.73 μm(图1E-图1F)。超微结构则显示分生孢子呈规则圆形,分生孢子梗较粗壮,孢子生长浓密(图1G-图1H)。

2.2　菌株分子生物学鉴定

使用PCR扩增目的菌株的rDNA-ITS序列片段,测序结果显示扩增片段为750 bp(图2),将该序列在GenBank数据库中进行BLAST比对,发现



A～B:菌株在PDA培养基上的正面和反面形态特征;C～D:菌株在PPDA培养基上的正面和反面形态特征;E～F:普通光学显微镜下菌株的分生孢子及产孢结构;G～H:扫描电子显微镜下菌株的分生孢子

A～B:Morphological characteristics of the positive and negative sides of the strain on PDA medium;C～D:Morphological characteristics of the positive and negative sides of the strain on PPDA medium;E～F:Conidia and sporulation structure of strains under ordinary light microscope;G～H:Conidia of strains under scanning electron microscope

图1 菌株QB10菌落、分生孢子及产孢结构形态

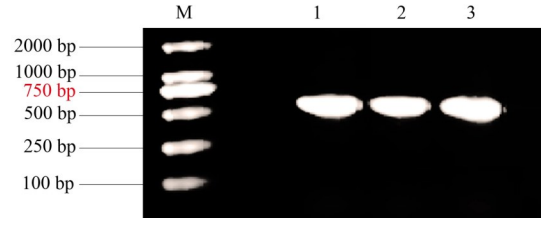
Fig.1 Colony, conidia, sporulation structure, and morphology of strain QB10

目的菌株的ITS序列与菌株*Beauveria bassiana* ARSEF 1564同源性高达99%。随后下载相关序列,并使用MEGA 7.0软件构建系统发育树(图3)。结果表明,菌株QB10与数据库中的其他球孢白僵菌菌株聚为一支。结合形态学特征鉴定与ITS序列分析的结果,确定该菌株为球孢白僵菌*B. bassiana*。

2.3 菌株QB10对草地贪夜蛾2龄幼虫的活性

2.3.1 菌株QB10对草地贪夜蛾2龄幼虫的致死中浓度

菌株QB10供试不同浓度的孢子悬浮液均对处



M:DL2000 DNA分子标准量;1～3:分离菌株QB10的ITS片段

M:DL2000 DNA Marker;1～3:isolate the ITS fragment of strain QB10

图2 菌株QB10 ITS基因片段的PCR扩增电泳图

Fig.2 PCR amplification electrophoresis of the ITS gene fragments of strains QB10

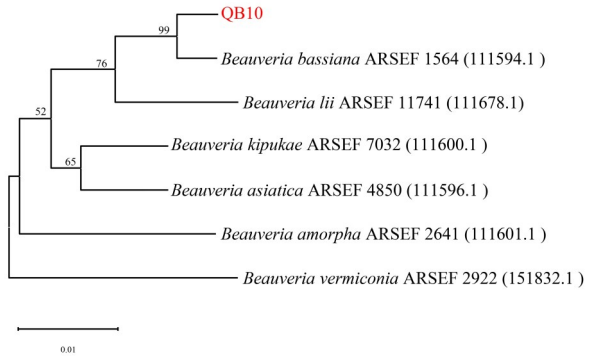


图3　基于ITS序列构建菌株QB10系统发育树分析

Fig.3　Phylogenetic analysis of strains QB10 constructed based on ITS sequence

理草地贪夜蛾2龄幼虫的表现生物活性,致病力随处理时间的延长而显著增加(表1)。在处理后1、3、5、7和10 d,试虫的LC_{50}分别为18.87×10^{7}、4.98×10^{7}、0.63×10^{7}、0.29×10^{7}和0.19×10^{7} cfu·mL^{-1}。

2.3.2　菌株QB10对草地贪夜蛾2龄幼虫的致死中时

菌株QB10对草地贪夜蛾2龄幼虫的致死中时随着孢子悬浮液浓度的增加而明显缩短(表2),浓度为1×10^{6} cfu·mL^{-1}和5×10^{6} cfu·mL^{-1}时,LT_{50}分别为16.12 d和8.32 d;浓度为1×10^{7} cfu·mL^{-1}和5×10^{7} cfu·mL^{-1}时,LT_{50}分别为1.95 d和2.87 d;当浓度增至1×10^{8} cfu·mL^{-1}时,草地贪夜蛾2龄幼虫的LT_{50}为1.56 d。

表1　菌株QB10对草地贪夜蛾2龄幼虫毒力(LC_{50})

Table1　Toxicity of strain QB10 to the second instar larvae of *S. frugiperda* (LC_{50})

处理时间/d Time	毒力回归方程 Regression equation of virulence	LC_{50}/($\times10^{7}$cfu·mL^{-1})	95%置信区间/($\times10^{7}$cfu·mL^{-1}) 95% confidence interval	相关系数 r
1	y=0.670x−0.541	18.87	6.12～58.18	0.997 2
3	y=0.494x+1.201	4.98	1.99～12.44	0.981 5
5	y=0.601x+0.917	0.63	0.34～1.16	0.932 5
7	y=0.653x+0.784	0.29	0.14～0.59	0.960 4
10	y=0.586x+1.317	0.19	0.08～0.47	0.947 5

表2　菌株QB10对草地贪夜蛾2龄幼虫毒力(LT_{50})

Table2　Toxicity of strain QB10 to the second instar larvae of *S. frugiperda* (LT_{50})

浓度/(cfu·mL^{-1}) Concentration	毒力回归方程 Regression equation of virulence	LT_{50}/d	95%置信区间/($\times10^{7}$cfu·mL^{-1}) 95% confidence interval	相关系数 r
1×10^{6}	y=1.328x+3.397	16.12	8.78−29.60	0.963 6
5×10^{6}	y=0.965x+4.112	8.32	5.14−13.47	0.935 0
1×10^{7}	y=1.151x+4.473	2.87	2.08−3.96	0.870 8
5×10^{7}	y=1.290x+4.627	1.95	1.35−2.81	0.924 2
1×10^{8}	y=1.140x+4.780	1.56	0.97−2.51	0.897 7

2.4　菌株的生物学特性

2.4.1　培养基种类对菌丝生长及产孢的影响

在5种培养基(PPDA、SMAY、SDAY、PDA、Czapek)上培养7 d,菌株QB10的菌丝生长和产孢存在明显差异(图4A)。其中,PPDA培养基最适合菌丝生长,菌落直径为3.75 cm,与PDA差异不显著,但显著优于SDAY、Czapek和SMAY 3种培养基。产孢以PPDA培养基最适合,培养14 d时的产孢量为4.25×10^{6} cfu·mL^{-1},显著超过其它培养基;其次是PDA培养基,产孢量为3.78×10^{6} cfu·mL^{-1}。菌株在Czapek培养基的菌落直径和产孢量均最小。综上所述,最适合菌株QB10生长和产孢的是PPDA培养基,最不适合的是Czapek培养基。

2.4.2　温度对菌丝生长及产孢的影响

菌株QB10在15～35 ℃内均可生长(图4B),25～28 ℃是其最佳生长温度,菌落直径分别为4.57和4.62 cm,显著高于其它温度处理;在产孢方面,28 ℃时产孢量最大,为4.25×10^{6} cfu·mL^{-1},其次为25 ℃;温度高于40 ℃时菌株无法生长和产孢。因此,28 ℃是最适培养温度,菌株QB10生长和产孢均达到最佳。

2.4.3　湿度对菌丝生长及产孢的影响

湿度对菌株QB10菌丝生长和产孢有显著性影响(图4C),随着湿度增加,菌落直径和产孢量递

增。在95%～100%的湿度下,菌丝生长最佳,其中100%湿度时菌落直径达峰值5.48 cm,显著高于其它处理;产孢最佳湿度为90%～100%,其中95%湿度时产孢量达峰值7.45×10^{6} cfu·mL^{-1}。相较其它处理组,65%湿度下菌丝生长和产孢显著下降。因此,100%湿度最适宜该菌株菌丝生长和产孢。

2.4.4 光照条件对菌丝生长及产孢的影响

光照条件(全光照、光暗交替、全黑暗)对菌株QB10菌丝生长和产孢的影响见图4D,全光照条件适合该菌的菌丝生长和产孢,菌落直径和产孢量分别为4.57 cm和4.72×10^{6} cfu·mL^{-1};其次为光暗交替,完全黑暗条件的产孢量最低。由此可知,QB10为喜光菌,全光照有利菌株QB10菌丝生长并能促进产孢。

2.4.5 pH对菌丝生长及产孢的影响

菌株QB10在pH 4至6时菌丝生长较好(图4E),最适pH为5,菌落直径为4.53 cm;产孢量在pH为6时最高,为4.25×10^{6} cfu·mL^{-1},pH为7时次之。综上,弱酸性环境有利于菌株QB10生长和产孢。

2.4.6 紫外线照射时间对菌丝生长及产孢的影响

短时间的紫外线照射处理对菌株QB10菌丝生长无明显影响,但对产孢有明显影响(图4F)。紫外线照射时间≤20 min时,各处理的菌落直径无明显差异;当照射时间达到30 min时,菌丝生长受到明显抑制作用,菌落直径明显小于其它处理。紫外线照射处理15 min时,菌株的产孢量与对照无明显差异,产孢量分别为1.85×10^{6}和1.80×10^{6} cfu·mL^{-1};其它照射时间的处理,产孢量均明显低于对照。可见,长时间紫外线照射对菌株QB10生长和产孢不利。

2.4.7 碳源对菌丝生长及产孢的影响

不同碳源类型对菌株QB10的菌丝生长和产孢能力具有显著影响(图4G)。其中,可溶性淀粉和麦芽糖最适合菌丝生长和产孢,菌落直径和产孢量分别为3.93、3.70 cm和3.17×10^{6}、3.20×10^{6} cfu·mL^{-1},显著高于其他处理。相比之下,乳糖虽能促进菌丝生长,菌落直径为3.65 cm,但其产孢能力较弱,产孢量仅为0.72×10^{6} cfu·mL^{-1}。三糖(棉籽糖)、单糖(果糖、葡萄糖)和多糖(玉米粉、纤维素)对菌丝生长和产孢效果较弱。在缺碳条件下,菌丝生长和产孢能力受到明显抑制,菌落直径降至1.57 cm,产孢量降至1.57×10^{6} cfu·mL^{-1}。综上,对于菌株QB10,可溶性淀粉和麦芽糖是理想的碳源选择,有利于菌丝生长和提高产孢量。

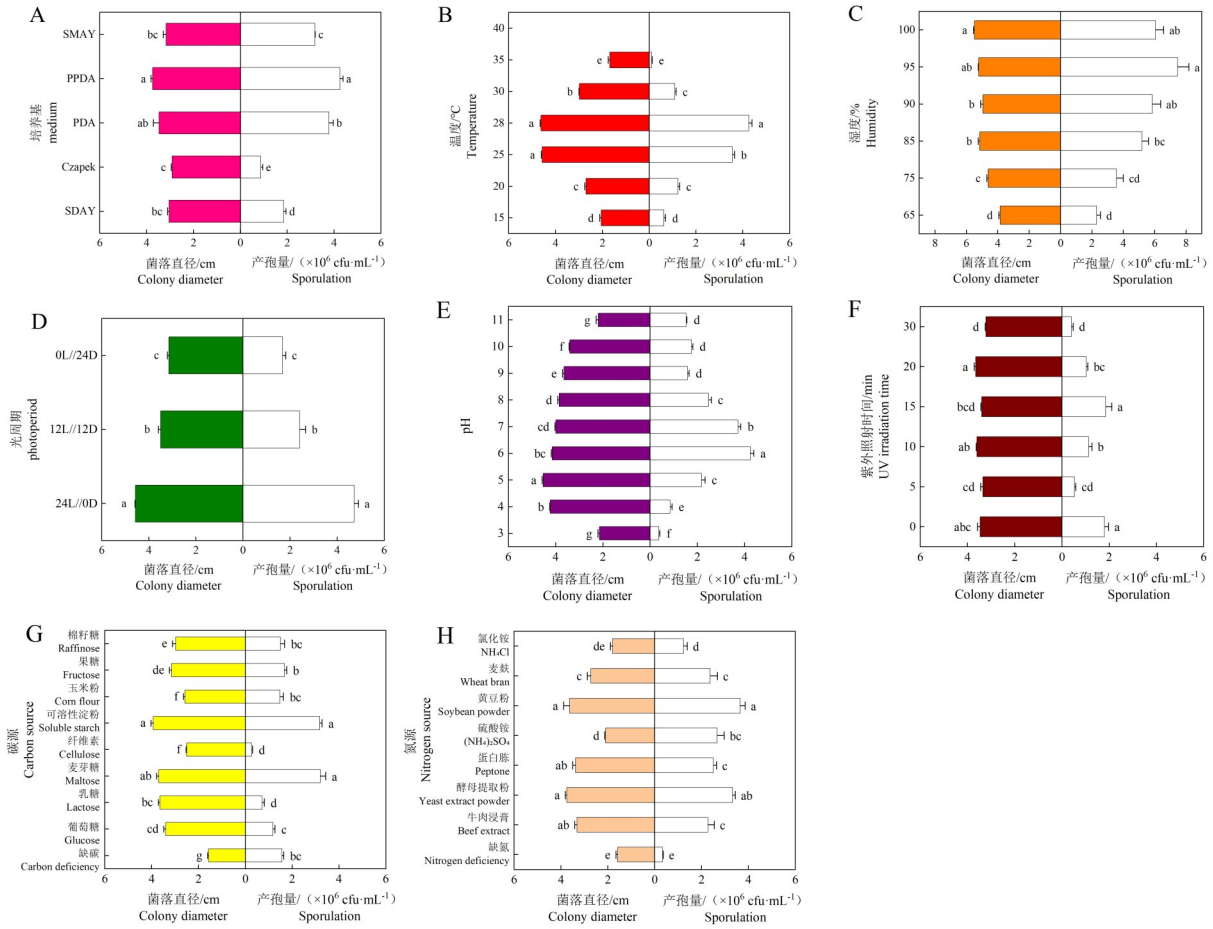
2.4.8 氮源对菌丝生长及产孢的影响

不同氮源类型对菌株QB10菌丝生长和产孢能力具有显著影响(图4H)。相比无机氮源,有机氮源(酵母提取粉、黄豆粉、牛肉浸膏、蛋白胨、麦麸)显著促进了菌丝生长和产孢能力。其中,酵母提取粉和黄豆粉的菌落直径和产孢量分别为3.75、3.63 cm和3.32×10^{6}、3.65×10^{6} cfu·mL^{-1},显著高于其它处理。牛肉浸膏、蛋白胨和麦麸次之。而无机氮源(硫酸铵和氯化铵)菌丝生长和产孢效果显著低于有机氮源。在缺氮条件下,菌丝生长和产孢能力受到明显抑制,菌落直径下减至1.58 cm,产孢量下降至0.33×10^{6} cfu·mL^{-1}。

3 讨论

高致病力昆虫病原真菌的筛选是草地贪夜蛾生物防控成功的关键所在,致死中浓度LC_{50}和致死中时LT_{50}是筛选高致病力菌株的基础。本研究从玉米地土壤成功分离一株菌株,通过形态学和ITS序列分析鉴定出该菌株为球孢白僵菌QB10,以草地贪夜蛾2龄幼虫进行毒力测定,发现球孢白僵菌QB10对草地贪夜蛾2龄幼虫的致病力随处理时间的延长而显著增加。幼虫LC_{50}值从处理1 d后的18.87×10^{7} cfu·mL^{-1}逐渐降低至处理10 d后的0.19×10^{7} cfu·mL^{-1},另外,菌株QB10的致死中时(LT_{50})随着孢子悬浮液浓度的增加而显著缩短。浓度为1×10^{6} cfu·mL^{-1}时,LT_{50}为16.12 d,而浓度为1×10^{8} cfu·mL^{-1}时,LT_{50}仅为1.56 d。与雷妍圆等[22]、李兆英等[23]利用球孢白僵菌对草地贪夜蛾的侵染效果相接近。

菌丝生长与产孢量等生物学特性,是评估虫生真菌生长性能优劣的重要标准。本研究发现,菌株QB10在温度28 ℃、100%湿度、pH为6及全光照环境下,以PPDA培养基生长最佳,且以可溶性淀粉、麦芽糖、酵母提取粉与黄豆粉的碳氮源组合更有利于其生长和产孢。通过比较前人的研究结果,可以发现,尽管温度、光照、湿度、pH值以及碳氮源等因素对球孢白僵菌的生长和产孢均有显著影响,但不同菌株间的最佳生长条件可能存在差异。例如,在湿度方面,国志峰等[24]和钱晶晶



数据为平均值,纵列数据后相同字母表示经DMRT法检验差异不显著($P<0.05$)

The data are average values. Different letters after the longitudinal data represent significant difference ($P<0.05$)

图4　不同培养基、温度、湿度、光照、pH、紫外线、碳源、氮源对菌株QB10菌丝生长和产孢量的影响

Fig.4　Effects of different media, temperature, humidity, light, pH, ultraviolet, carbon source and nitrogen source on mycelial growth and sporulation of strain QB10

等[25]对菌株Bb11和Bb01的研究均强调了湿度为100%时,球孢白僵菌的菌丝生长速度最快。这与本研究中QB10菌株在100%湿度下生长良好的结果相一致。在温度方面,李嘉等[26]的研究表明26 ℃是球孢白僵菌生长的一个较佳温度,但本研究发现QB10菌株在28 ℃时生长最佳,这突显了不同菌株在温度需求上的差异。在光照条件上,黄鹏等[27]的研究显示8 h光照与16 h黑暗的光照循环有利于BB-T02菌株的生长,而本研究则发现全光照条件下QB10菌株的生长最佳,这进一步说明了不同菌株对光照条件有不同的适应性。在碳源和氮源的选择上,刘晓晓等[28]的研究表明葡萄糖与酵母提取物作为碳氮源对球孢白僵菌的生长具有显著优势,但本研究发现可溶性淀粉、麦芽糖、酵母提取粉和黄豆粉的组合更有利于QB10菌株的生长和产孢,这些生物学特性上的差异,可能源自于不同地理和寄主来源的影响。

4　结论

本研究成功分离鉴定的虫生真菌为球孢白僵菌QB10,该菌株对草地贪夜蛾2龄幼虫具有高致病力。此外,该菌株的生长温度适应广,高湿度环境下产孢效果最佳,耐酸性强,受光照调控,同时对多种碳氮源利用率高。

参　考　文　献

[1]高红,张冉,万永继. 白僵菌的分类研究进展[J]. 蚕业科学,2011,37(4):730-736.
Gao H, Zhang R, Wan Y J. Advance of studies on classification of genus *Beauveria*[J]. Acta Sericologica Sinica, 2011, 37(4): 730-736.

[2]Goettel M S, Leger R J S, Rizzo N W, et al. Ultrastructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the

entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexto*) cuticle[J]. Microbiology, 1989,135(8):2233-2239.

[3]Pedrini N, Crespo R, Juárez M P. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi [J]. Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology:CBP,2007,146(1-2):124-137.

[4]Valero-Jiménez C A, Wiegers H, Zwaan B J, et al. Genes involved in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2016, 133: 41-49.

[5]Rehner S A, Buckley E P. Isolation and characterization of microsatellite loci from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycota: hypocreales) [J]. Molecular Ecology Notes,2003,3(3):409-411.

[6]Wang C S, Wang S B. Insect pathogenic fungi: genomics, molecular interactions, and genetic improvements [J]. Annual Review of Entomology,2017,62:73-90.

[7]Montezano D G, Specht A, Sosa-Gómez D R, et al. Host plants of*Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas[J]. African Entomology,2018,26(2):286-300.

[8]Early R, González-Moreno P, Murphy S T, et al. Forecasting the global extent of invasion of the cereal pest *Spodoptera frugiperda*, the fall armyworm[J]. NeoBiota,2018,40:25-50.

[9]吴孔明. 中国草地贪夜蛾的防控策略[J]. 植物保护,2020,46(2):1-5.
Wu K M. Management strategies of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) in China[J]. Plant Protection, 2020, 46(2):1-5.

[10]姜玉英,刘杰,朱晓明. 草地贪夜蛾侵入我国的发生动态和未来趋势分析[J]. 中国植保导刊,2019,39(2):33-35.
Jiang Y Y, Liu J, Zhu X M. Analysis on the occurrence dynamics and future trend of *Spodoptera exigua* invading China [J]. China Plant Protection,2019,39(2):33-35.

[11]杨学礼,刘永昌,罗茗钟,等. 云南省江城县首次发现迁入我国西南地区的草地贪夜蛾[J]. 云南农业,2019(1):72.
Yang X L, Liu Y C, Luo M Z, et al. The first discovery of *Spodoptera frugiperda* in Jiangcheng County, Yunnan Province, which moved to southwest China [J]. Yunnan Agriculture,2019(1):72.

[12]Gui F R, Lan T M, Zhao Y, et al. Genomic and transcriptomic analysis unveils population evolution and development of pesticide resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda* [J]. Protein & Cell,2022,13(7):513-531.

[13]邹春华,刘继辉,吴伟,等. 草地贪夜蛾病原白僵菌的分离鉴定及其致病力研究[J]. 植物保护,2023,49(6):242-246.
Zou C H, Liu J H, Wu W, et al. Isolation and identification of entomopathogenic fungi *Beauveria* to *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and its virulence [J]. Plant Protection,2023,49(6):242-246.

[14]毕思佳,吴晨源,胡本进,等. 球孢白僵菌Bb378菌株的分离、鉴定及对草地贪夜蛾的致病性研究[J]. 应用昆虫学报,2023,60(4):1223-1232.
Bi S J, Wu C Y, Hu B J, et al. Isolation and identification of the *Beauveria bassiana* Bb378 strain and its pathogenicity to *Spodoptera furgiperda* [J]. Chinese Journal of Applied Entomology,2023,60(4):1223-1232.

[15]温绍海,庞继鑫,杜广祖,等. 2株感染蠼螋的球孢白僵菌的分离鉴定及对草地贪夜蛾的毒力[J]. 植物保护,2022,48(4):318-323,362.
Wen S H, Pang J X, Du G Z, et al. Isolation and identification of two *Beauveria bassiana* strains from the infected earwig and their virulence to *Spodoptera frugiperda* larvae [J]. Plant Protection,2022,48(4):318-323,362.

[16]程东美,洪婉雯,孙辉,等. 草地贪夜蛾幼虫僵虫发生率调查及致病菌分离鉴定[J]. 环境昆虫学报,2020,42(6):1298-1304.
Cheng D M, Hong W W, Sun H, et al. Survey on the cadaver rates of *Spodoptera frugiperda* and isolation of pathogenic strain [J]. Journal of Environmental Entomology, 2020, 42(6):1298-1304.

[17]方中达. 植病研究法(第三版)[M]. 中国农业出版社,1998:50.
Fang Z D. Research method of plant disease (3rd Edition) [M]. China Agriculture Press, 1998:50.

[18]史红霞,胡明龙,阎峻. 球孢白僵菌选择性培养基的筛选和检测应用[J]. 浙江林学院学报,2002,19(2):161-165.
Shi H X, Hu M L, Yan J. Selection of culture medium of *Beauveria bassiana* parasitized in Strobilomyla and inspection of pathogen in soil[J]. Journal of Zhejiang A & F University, 2002,19(2):161-165.

[19]张婧. 闽粤琼三省土壤虫生真菌分离鉴定及生物活性研究[D]. 广州:华南农业大学,2017.
Zhang J. Isolation, identification and biological activity of soil entomogenous fungi in Fujian, Guangdong and Qiong Provinces [D]. Guangzhou:South China Agricultural University,2017.

[20]林肖. 不同白僵菌的植物内生性及其抗番茄灰霉病研究[D]. 长春:吉林农业大学,2022.
Lin X. Study on plant endogeneity of different *Beauveria bassiana* and its resistance to tomato gray mold [D]. Changchun:Jilin Agricultural University,2022.

[21]周凡莉,黄林,金素钰,等. 用Chelex-100法大规模快速提取牦牛肌肉中基因组DNA[J]. 西南民族大学学报(自然科学版),2018,44(4):347-351.
Zhou F L, Huang L, Jin S Y, et al. Rapid and large-scale extraction of genomic DNA from yak muscles using Chelex-100 method [J]. Journal of Southwest Minzu University (Natural Science Edition),2018,44(4):347-351.

[22]雷妍圆,章玉苹,薛志洪,等. 一株球孢白僵菌的分离鉴定及其对草地贪夜蛾的致病性[J]. 环境昆虫学报,2020,42(3):593-601.
Lei Y Y, Zhang Y P, Xue Z H, et al. Isolation and identification of a *Beauveria bassiana* isolate and its pathogenicity to *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)[J]. Journal of Environmental Entomology,2020, 42(3):593-601.

[23]李兆英,欧阳恺昱,胡叶,等. 球孢白僵菌对草地贪夜蛾的毒力及组织病理学研究[J]. 湖北植保,2023(3):11-16.
Li Z Y, Ouyang K Y, Hu Y, et al. Study on toxicity and histopathology of *Beauveria bassiana* to *Spodoptera exigua* [J]. Hubei Plant Protection,2023(3):11-16.

[24]国志峰,邵洪波,刘洪亮,等. 球孢白僵菌Bb11菌株生物学特性研究[J]. 河北林果研究,2010,25(1):57-60,75.
Guo Z F, Shao H B, Liu H L, et al. Study on the biological characteristic of *Beauveria bassiana* Bb11[J]. Forestry and Ecological Sciences,2010,25(1):57-60,75.

[25]钱晶晶,迟德富,丁俊男. 球孢白僵菌Bb01菌株的生物学特性[J]. 安徽农业科学,2015,43(27):374-379.
Qian J J, Chi D F, Ding J N. Biological characteristics of *Beauveria bassiana* Bb01 strain [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences,2015,43(27):374-379.

[26]李嘉,任佳慧,刘艳微,等. 球孢白僵菌生物学特性研究进展及其杀虫效果展望[J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报,2014,30(4):98-100.
Li J, Ren J H, Liu Y W, et al. Research progress on biological characterics of beauvria *Bassiana* and the prospect of its insecticidal effect [J]. Natural Science Journal of Harbin Normal University,2014,30(4):98-100.

[27]黄鹏,姚锦爱,余德亿,等. 球孢白僵菌BB-T02生物学特性及对两种检疫性粉蚧的侵染活性[J]. 中国生物防治学报,2022,38(2):342-348.
Huang P, Yao J A, Yu D Y, et al. Biological characteristics and infection activity of *Beauveria bassiana* BB-T02 against two quarantine mealybugs[J]. Chinese Journal of Biological Control,2022,38(2):342-348.

[28]刘晓晓,王星冉,王义勋,等. 马尾松毛虫高毒力球孢白僵菌菌株的生物学特性[J]. 南方农业学报,2017,48(6):1019-1023.
Liu X X, Wang X R, Wang Y X, et al. Biological characteristics of highly virulent strains of *Beauveria bassiana* for *Dendrolimus punctatus* [J]. Journal of Southern Agriculture,2017,48(6):1019-1023.

Isolation, identification, biological characteristics, and insecticidal activity of a *Beauveria bassiana* strain against *Spodoptera frugiperda* larvae

Ye Junhao[1], He Jingchao[1], Wei Yanhua[1], Ou Guangmin[1], Zhang Zhixiang[2], Cheng Dongmei[1*]

(*1.School of Agriculture and Biology, Zhongkai University of Agricultural Engineering, Guangzhou 510225, China; 2.State Key Laboratory of Green Pesticides, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China*)

Abstract: [Objective] To Current study aimed to explore fungal resources with high insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* larvae. [Method] In this experiment, a strain of *Beauveria bassiana* (designated QB10) was successfully isolated and purified from soil using a selective medium for *B. bassiana*. The strain was identified based on morphological characteristics and rDNA-ITS sequence analysis. The insecticidal activity against 2nd instar larvae of *S. frugiperda* was evaluated using an immersion method, and the biological characteristics of the strain were studied. [Result] Strain QB10 was identified as *B. bassiana*. Strain QB10 exhibited strong pathogenicity against *S. frugiperda* larvae, with its virulence positively correlated with treatment duration and spore suspension concentration. The median lethal concentration values for 2nd -instar larvae at 1, 3, 5, 7, and 10 days post-treatment were 18.87×10^7、4.98×10^7、0.63×10^7、0.29×10^7 and 0.19×10^7 cfu·mL^{-1}, respectively. As the spore suspension concentration increased from 1×10^6 cfu·mL^{-1} to 1×10^8 cfu·mL^{-1}, the median lethal time (LT_{50}) decreased from 16.12 days to 1.56 days. In terms of biological characteristics, strain QB10 showed optimal mycelial growth and sporulation on PPDA medium under conditions of 28 ℃, 100% humidity, pH 6, and full light. The best carbon sources were soluble starch and maltose, with colony diameter and sporulation levels of 3.93 cm, 3.70 cm, 3.17×10^6 cfu·mL^{-1}, 3.20×10^6 cfu·mL^{-1}, respectively. The optimal nitrogen sources were yeast extract and soybean powder, with colony diameters and sporulation levels of 3.75 cm, 3.63 cm, and 3.32×10^6 cfu·mL^{-1} , 3.65×10^6 cfu·mL^{-1}, respectively. The strain grew within a temperature range of 15 to 35 ℃, with 40 ℃ being lethal. Short-term UV exposure (≤20 minutes) did not significantly affect mycelial growth but inhibited sporulation. [Conclusion] The *B. bassiana* strain QB10 exhibited high activity against *S. frugiperda* larvae and demonstrated good adaptability to vegetative growth and sporulation conditions, making it a promising biological control resource for *S. frugiperda*.

Kewords: *Beauveria bassiana*, Identification, *Spodoptera frugiperda*, Pathogenicity, Biological characteristics

(编辑:吕俊俐)