

周鹏飞, 张婧, 张博文, 等. 玫烟色棒束孢的遗传地理差异及对 B 型烟粉虱的致病性[J]. 华南农业大学学报, 2018, 39(3): 60-64.

玫烟色棒束孢的遗传地理差异及 对 B 型烟粉虱的致病性

周鹏飞, 张 婧, 张博文, 胡琼波
(华南农业大学 农学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】研究不同地区玫烟色棒束孢 *Isaria fumosorosea* 的遗传地理差异, 探讨其对 B 型烟粉虱 *Bemisia tabaci* 的致病性。【方法】从广东、福建和青海地区土壤分离得到 16 株玫烟色棒束孢菌株用生物信息学的方法分析供试菌株 ITS 序列的相似性, 并构建系统发育树; 采用浸渍法测定供试菌株分生孢子对 B 型烟粉虱 2 龄若虫的生物活性。【结果】供试菌株与参考菌株 (KX057373.1、KX057375.1) ITS 序列的相似性高于 97.7%; 9 株广东菌株与 6 株福建菌株的 ITS 序列没有地理差异; 青海菌株 IfTS01 与参考菌株 KX057375.1 的 ITS 序列几乎相同, 且与福建菌株 IfFJ02、IfFJ06 及广东菌株 IfGD17 的 ITS 序列高度相似。16 株菌株均以孢子剂量 10^7 mL^{-1} 处理 B 型烟粉虱 2 龄若虫, 处理后第 10 天若虫的病死率为 47%~86%; 其中, 菌株 IfFJ06、IfGD02 和 IfTS01 处理后的 B 型烟粉虱 2 龄若虫病死率达 80% 以上。【结论】不同地区的玫烟色棒束孢菌株 ITS 序列没有明显的地理差异, 其对烟粉虱的致病力与 ITS 序列及地理分布没有关系。研究发现 3 株对烟粉虱致病力较高的菌株, 具有进一步研究价值。

关键词: 玫烟色棒束孢; 同源性; 烟粉虱; 生物活性; ITS 序列
中图分类号: S476.12 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-411X(2018)03-0060-05

Genetic geographical difference of *Isaria fumosorosea* and its pathogenicity against B-biotype *Bemisia tabaci*

ZHOU Pengfei, ZHANG Jing, ZHANG Bowen, HU Qiongbo
(College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To study the genetic geographical difference of *Isaria fumosorosea* strains isolated from different regions, and the pathogenicity of *I. fumosorosea* to B-biotype *Bemisia tabaci*. 【Method】Sixteen strains of *I. fumosorosea* were isolated from soils of Guangdong, Fujian, and Qinghai. The bioinformatics analysis was used to identify ITS sequences similarities of the 16 strains, and the pathogenetic tree was constructed. The immersion method was employed to evaluate the pathogenicities of *I. fumosorosea* strains against second-instar nymphs of B-biotype *B. tabaci*. 【Result】The ITS sequences similarities between the test *I. fumosorosea* strains and the reference strains(KX057373.1, KX057375.1) were over 97.7%. Nine strains from Guangdong and six strains from Fujian had no geographic difference. The ITS sequence of Qinghai strain IfTS01 was almost the same as that of reference strain (KX057375.1), and highly similar to the strain IfFJ02、IfFJ06 of Fujian and strain IfGD17 of Guangdong. The fatality rate of B-biotype *B. tabaci* ranged from 47% to 86% after 10 days treatment with 10 mL^{-1} conidia of the 16 *I. fumosorosea* strains. The most effective strains, IfFJ06, IfGD02 and IfTS01, caused above 80% fatality rate of *B. tabaci*. 【Conclusion】There is no obvious

difference of genetic geography among ITS sequences of *I. fumosorosea* strains isolated from different areas. The pathogenicity of *I. fumosorosea* strains against *B. tabaci* is not related to its geographical distribution and ITS sequence similarity. There are three strains with high pathogenicity to *B. tabaci*, which can be used for further research.

Key words: *Isaria fumosorosea*; homology; *Bemisia tabaci*; biological activity; ITS sequence

烟粉虱 *Bemisia tabaci* Gennadius 是一个正在快速进化的复合种, 其生物型 B 与 Q 是重要入侵害虫^[1-2]。B 型烟粉虱于 20 世纪 90 年代传入我国, 几年时间内就扩散至全国除青藏高原以外的地方, 严重威胁农作物生产, 它通过口针直接刺吸植物汁液, 分泌大量的蜜露引发煤污病, 更为严重的是它还能传播双生病毒引起植物黄化曲叶等植物病害^[3-4]。虫生真菌的利用是防治烟粉虱的重要手段, 在前期研究中, 已发现烟粉虱在田间自然条件下可感染玫烟色棒束孢 *Isaria fumosorosea*, 分离筛选了生物活性较高的玫烟色棒束孢菌株; 并且发现该菌在致病烟粉虱的同时, 可减轻番茄黄化曲叶病毒病 (Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV) 的传播^[5-7]。玫烟色棒束孢是一种重要的虫生真菌, 地理分布广泛, 能够寄生同翅目、半翅目、双翅目、鞘翅目和膜翅目等多种昆虫, 对烟粉虱、小菜蛾 *Plutella xylostella* Linnaeus、柑橘木虱 *Diaphorina citri* Kuwayama、红火蚁 *Solenopsis invicta* Buren, 以及朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* Boisduval 等重要害虫具有生物应用潜力^[8-12]。20 世纪 90 年代以来, 对玫烟色棒束孢的鉴定分离、培养性状、代谢产物、遗传变异、致病性及应用等方面的研究显著增加^[13-14]。本研究拟通过对广东、福建和青海省的玫烟色棒束孢进行 ITS 序列比对, 研究不同地区的玫烟色棒束孢间的亲缘关系, 同时测定菌株对 B 型烟粉虱的致病力, 分析玫烟色棒束孢菌的地理遗传性, 及对烟粉虱致病性的影响, 为利用玫烟色棒束孢防治烟粉虱提供新材料与科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

16 株玫烟色棒束孢菌株为华南农业大学天然农药与化学生物学教育部重点实验室从广东省、福建省和青海省不同地区采集土壤经分离鉴定的菌株 (表 1)。取斜面菌种接种至 PDA 培养基平板上培养 2~3 周, 收集分生孢子, 并用 *w* 为 0.02% 的吐温-80 溶液悬浮, 用血球计数板法调整孢子悬浮液浓度为 10⁷ mL⁻¹, 备用。

烟粉虱为华南农业大学天然农药与化学生物学教育部重点实验室保存的 B 型烟粉虱品系, 在盆栽棉花 *Gossypium* spp. 品种鲁傲 7886 苗上饲养, 选择 2 龄若虫供生物测定。

http://xuebao.scau.edu.cn

表 1 来自不同地区的 16 株玫烟色束孢菌株
Tab. 1 Sixteen *Isaria fumosorosea* strains isolated from different regions

菌株名称	来源地	菌株名称	来源地
IfFJ01	福建南平市建阳区	IfGD12	广东梅县
IfFJ02	福建连城县	IfGD14	广东恩平市
IfFJ04	福建福安市	IfGD15	广东惠东县
IfFJ05	福建沙县	IfGD17	广东博罗县
IfFJ06	福建武夷山市	IfGD18	广东龙门县
IfFJ17	福建永安市	IfGD20	广东龙门县
IfGD02	广东饶平县	IfGD21	广东中山市三乡镇
IfGD07	广东徐闻县	IfTS01	青海门源县

1.2 方法

1.2.1 玫烟色棒束孢菌株的同源性分析 根据供试菌株的 ITS 序列 (引物 ITS1: 5'-tccgtaggtgaacctgcgg-3'; ITS4: 5'-tcctccgcttattgatatgc-3'), 在 Genbank 中搜索已经报道的玫烟色棒束孢 ITS 序列 (KX057373.1、KX057375.1), 用 MegAlign 软件中的 Clustal W 和 Phylogenetic tree 对 ITS 序列进行相似性分析和系统树的构建。

1.2.2 玫烟色棒束孢对烟粉虱的致病性测定 采用离体叶片浸渍法测定玫烟色棒束孢对烟粉虱的生物活性。剪切带有 B 型烟粉虱 2 龄若虫的棉花叶片 (每片叶 50 头以上), 在配好的 10⁷ mL⁻¹ 的玫烟色棒束孢分生孢子悬浮液中浸泡 20 s 后晾干, 设 *w* 为 0.02% 的吐温-80 溶液为空白对照, 在叶柄处包裹含有植物营养液 (氮、磷、钾质量比为 1:2:1) 的棉花叶片, 置于直径为 9 cm 的培养皿中, 在光周期为 14 h 光:10 h 暗、温度 (25±1) °C、相对湿度 (70±10)% 的光照培养箱中培养。从第 2 天开始, 每 48 h 在解剖镜下检查若虫生长存活情况, 若虫虫体干瘪、颜色变枯黄者即视为死亡, 继续保湿培养观察虫体是否长出玫烟色棒束孢, 验证是否为病死虫, 统计病死率, 每个处理重复 3 次。

1.3 数据处理

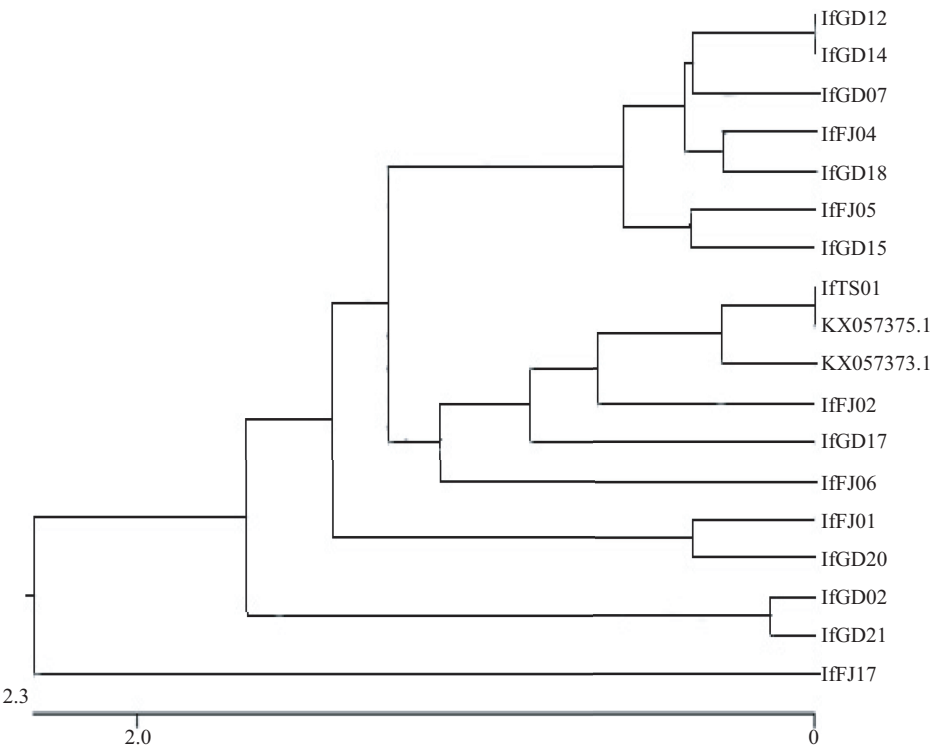
根据 Abbott 公式计算校正后的累积病死率^[15]。数据处理采用 SPSS 软件, 差异显著性分析用 Duncan’s 法; 半致死时间 (LT₅₀) 用 SPSS 软件中的 Probit analysis 进行分析。

2 结果与分析

2.1 各地区玫烟色棒束孢的 ITS 序列相似性分析

将供试玫烟色棒束孢菌株的 ITS 序列与参考

菌株构建系统发育树 (图 1), 结果发现除了来自福建的 IfFJ17 菌株与参考菌株 (KX057375.1、KX057373.1) 的 ITS 序列相似性为 97.7% 外, 其余 15 个菌株与参考菌株 (KX057375.1、KX057373.1) ITS 序列的相似性均高于 98.0%。但是, 结果显示供试菌株没有明显的地域性遗传分化倾向, 比如, 来自青海的 IfTS01 菌株与参考菌株 KX057375.1 的 ITS 序列几乎相同, 也与福建菌株 IfFJ02、IfFJ06 及广东菌株 IfGD17 的 ITS 序列高度相似。



福建菌株 (IfFJ01、IfFJ02、IfFJ04、IfFJ05、IfFJ06、IfFJ17), 广东菌株 (IfGD02、IfGD07、IfGD12、IfGD14、IfGD15、IfGD17、IfGD18、IfGD20、IfGD21), 青海菌株 (IfTS01)

图 1 基于 ITS 基因序列构建的玫烟色棒束孢系统发育树
Fig. 1 Phylogenetic tree of *Isaria fumosorosea* based on ITS gene sequences

2.2 玫烟色棒束孢对烟粉虱的致病性

供试的 16 株玫烟色棒束孢对 2 龄烟粉虱均有致病作用, 但不同菌株对烟粉虱 2 龄若虫的致病力不同 (表 2)。

由表 2 可知, 以玫烟色棒束孢 10⁷ mL⁻¹ 分生孢子悬浮液处理后, 烟粉虱的病死率随时间延长而增多, 处理后第 2 天, 未发现烟粉虱死亡现象; 处理后第 4 天, 烟粉虱病死 9%~26%; 处理后第 6 天与第 8 天, 病死率分别达到 24%~53% 与 41%~72%。至处理后第 10 天, 不同菌株对烟粉虱致病力差异增大, 病死率达到 80% 以上的菌株有来自福建的菌

株 IfFJ06、广东的菌株 IfGD02 与青海菌株 IfTS01; 病死率低于 60% 的菌株有福建的 IfFJ02、IfFJ04、IfFJ17 与广东的 IfGD20; 而其他菌株处理的烟粉虱具有 70%~80% 的病死率。不同菌株的致死中时间 LT₅₀ 也存在差异, 其中 IfTS01 菌株的 LT₅₀ 最短, 小于 6 d, IfFJ04 的 LT₅₀ 最长, 大于 10 d (表 3)。试验结果显示, 广东、福建与青海菌株对烟粉虱都有致病力, 且致病力强弱与菌株地理来源没有明显关系, 青海虽然不是 B 型烟粉虱的分布地, 但其菌株 IfTS01 仍然对烟粉虱有效, 可见, 供试菌株对 B 型烟粉虱的致病力未表现出明显的地理分化现象。

表 2 B 型烟粉虱 2 龄若虫被玫烟色棒束孢菌株侵染后的病死率¹⁾

Tab. 2 Fatality rates of the second instar nymphs of B-biotype *Bemisia tabaci* after infected with *Isaria fumosorosea* strains

菌株名称	第2天	第4天	第6天	第8天	第10天
IfFJ01	0	9.23±1.63e	30.84±1.98bcd	48.84±2.91de	70.60±0.87de
IfFJ02	0	9.04±2.96e	24.11±6.39e	47.57±3.20de	53.65±4.49f
IfFJ04	0	9.03±1.07de	30.83±2.01de	41.23±2.49e	47.63±3.24f
IfFJ05	0	12.68±2.22de	36.30±2.32cde	56.20±1.99cb	71.59±1.41e
IfFJ06	0	13.31±1.10cde	50.75±1.54a	70.51±2.48a	80.97±1.88ab
IfFJ17	0	9.20±0.57e	30.58±2.26de	44.58±2.31e	53.80±1.70f
IfGD02	0	10.96±1.59de	41.96±2.11abc	71.03±1.46a	85.45±0.54a
IfGD07	0	9.22±0.77e	36.48±1.21bcd	71.14±3.04a	77.04±1.06bcd
IfGD12	0	9.06±0.66e	37.21±1.13bcd	64.79±3.05ab	79.85±3.35abc
IfGD14	0	19.87±2.03b	50.12±1.89a	66.68±0.38a	73.51±1.67cde
IfGD15	0	15.34±3.28bcd	45.14±1.05ab	68.28±2.37a	79.28±1.58abc
IfGD17	0	14.51±0.54bcde	45.96±3.17ab	65.09±3.12ab	79.17±1.75abc
IfGD18	0	12.86±0.87cde	41.39±3.47abc	58.36±2.96bc	72.03±2.35de
IfGD20	0	12.25±1.17cde	30.51±2.84de	41.54±2.29e	53.55±2.74f
IfGD21	0	17.66±0.69bc	37.23±0.46bcd	58.91±1.17bc	71.40±0.68de
IfTS01	0	25.36±3.60a	52.46±2.64a	69.53±1.63a	82.28±1.59ab

1)表中数据为校正病死率的平均值±标准误; 同列数据后凡是具有一个相同小写字母者, 表示差异不显著 ($P > 0.05$, Duncan's 法)

表 3 玫烟色棒束孢菌株对 B 型烟粉虱 2 龄若虫的半致死时间

Tab. 3 LT_{50} of *Isaria fumosorosea* strains to the second instar nymphs of B-biotype *Bemisia tabaci*

菌株名称	LT_{50}/d	$LT_{50}95\%$ 置信区间/d	菌株名称	LT_{50}/d	$LT_{50}95\%$ 置信区间/d
IfFJ01	7.25	6.56~8.11	IfGD12	6.50	5.94~7.11
IfFJ02	8.21	7.30~9.61	IfGD14	6.00	5.44~6.60
IfFJ04	>10	>10	IfGD15	6.04	5.44~6.66
IfFJ05	6.94	6.28~7.22	IfGD17	6.35	5.77~6.98
IfFJ06	6.13	5.61~6.67	IfGD18	6.71	6.05~7.47
IfFJ17	8.19	7.28~9.59	IfGD20	8.14	7.25~9.48
IfGD02	6.22	5.68~6.77	IfGD20	6.72	6.08~7.48
IfGD07	6.57	6.01~7.17	IfTS01	5.74	5.13~6.36

3 讨论与结论

有研究认为玫烟色棒束孢是一个复合种, 存在显著的遗传分化现象^[1]。本研究发现来自福建的 IfFJ17 菌株与参考菌株的 ITS 序列相似性最低, 只有 97.7%, 而其他 15 个菌株的序列相似性都高于 98.0%, 说明我国的玫烟色棒束孢菌可能存在较大的种内分化倾向。然而, 本研究中来自广东、福建菌株的 ITS 序列并未表现出地理特征, 青海菌株与广东、福建菌株的 ITS 序列也没有明显的地理分界, 说明玫烟色棒束孢在上述地区并没有明显的遗传地理分化倾向, 可能原因是这些地区的基因交流较

多, 遗传性趋于相同。

不同菌株对 B 型烟粉虱的致病力是有显著差异的, 福建菌株 IfFJ06、广东菌株 IfGD02 及青海菌株 IfTS01 引起烟粉虱的病死率高于 80%, 而福建的 IfFJ02、IfFJ04、IfFJ17 与广东的 IfGD20 菌株引起烟粉虱的病死率低于 60%, 其他菌株则具有 70%~80% 的烟粉虱病死率。可见, 玫烟色棒束孢对烟粉虱的致病性似乎与其产地关系不大, 各地均可发现致病力较强的菌株。来源于福建的低致病力菌株较多而广东的较少, 这一方面可能与供试 B 型烟粉虱是广东品系有关, 广东品系烟粉虱与广东玫烟

色棒束孢菌株间可能存在协同进化关系。另一方面也可能与供试菌株的数量不足有关。然而, 青海菌株 IfTS01 产自无 B 型烟粉虱分布的地区, 它仍然具有较高的烟粉虱致病力。因此, 上述猜想还需要进一步研究证明。

综上所述, 本研究认为来自我国广东、福建与青海等地区的玫烟色棒束孢菌具有遗传多样性, 但没有遗传地理分化特征, 其对 B 型烟粉虱的致病力具有显著差异, 但致病力与菌株的产地没有明显关系。本研究初步筛选的 IfFJ06、IfGD02 与 IfTS01 菌株对烟粉虱具有较高致病力, 有进一步研究价值。

参考文献:

[1] BROWN J K, FROHLICH D R, ROSELL R C. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: Biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex?[J]. Annu Rev Entomol, 2003, 40(1): 511-534.

[2] BROWN J K, CZOSNEK H. Whitefly transmission of plant viruses[J]. Adv Bot Res, 2002, 36(2): 65-76.

[3] 李庆亮, 谭伟, 薛明. B 型烟粉虱危害对烟草叶片光系统 II 的影响[J]. 中国农业科学, 2012, 45(19): 3988-3995.

[4] 张友军, 朱国仁, 褚栋, 等. 我国蔬菜作物重大入侵害虫发生、危害与控制[J]. 植物保护, 2011, 37(4): 1-6.

[5] DONG T Y, ZHANG B W, JIANG Y F, et al. Isolation and classification of fungal whitefly entomopathogens from soils of Qinghai-Tibet Plateau and Gansu Corridor in China[J]. Plos One, 2016, 11(5): e0156087.

[6] ZHANG B W, ZOU C, HU Q B. Effects of *Isaria fumosorosea* on TYLCV (Tomato yellow leaf curl virus) accumulation and transmitting capacity of *Bemisia tabaci*[J]. PloS One, 2016, 11(10): e0164356.

[7] HU Q B, WU W. Recombinant fungal entomopathogen

RNAi target insect gene[J]. Bioengineered, 2016, 7(6): 504-507.

[8] 吴丹丹, 黄少华, 章玉苹, 等. 玫烟色拟青霉固体培养基筛选及培养条件研究[J]. 广东农业科学, 2015, 42(15): 43-47.

[9] 吕利华, 武亚敬, 何余容, 等. 玫烟色拟青霉亚致死浓度对小菜蛾取食和成虫生殖的影响[J]. 中国生物防治学报, 2007, 23(4): 322-327.

[10] WRAIGHT S P, CARRUTHERS R I, JARONSKI S T, et al. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*[J]. Biol Control, 2000, 17(3): 203-217.

[11] SHI W B, FENG M G. Lethal effect of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces fumosoroseus* on the eggs of *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) with a description of a mite egg bioassay system[J]. Biol Control, 2004, 30(2): 165-173.

[12] HU Q B, LIU S Y, YIN F, et al. Diversity and virulence of soil-dwelling fungi *Isaria* spp. and *Paecilomyces* spp. against *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae)[J]. Biocontrol Sci Techn, 2011, 21(2): 225-234.

[13] ZHOU F, SHAUKAT A, HUANG Z. Influence of the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* on *Axinoscyrmus cardilobus* (Coleoptera: Coccinellidae) under laboratory conditions[J]. Biocontrol Sci Techn, 2010, 20(7): 709-722.

[14] 梅利, 朱振宇, 刘永翔, 等. 玫烟色棒束孢几丁质酶基因部分序列的克隆及分析[J]. 贵州农业科学, 2010, 38(3): 19-22.

[15] ABBOTT W S. A method of computing the effectiveness of an insecticide[J]. J Econ Entomol, 1925, 18(2): 265-267.

【责任编辑 霍 欢】