

陈中琴, 梁文龙, 黄丽萍, 等. 29 株虫生真菌的鉴定及对烟粉虱的毒力 [J]. 华南农业大学学报, 2020, 41(4): 57-67.
CHEN Zhongqin, LIANG Wenlong, HUANG Liping, et al. Identification of 29 strains of entomogenous fungi and their toxicity to *Bemisia tabaci*[J]. Journal of South China Agricultural University, 2020, 41(4): 57-67.

29 株虫生真菌的鉴定及对烟粉虱的毒力

陈中琴[†], 梁文龙[†], 黄丽萍, 沈斌斌

(广东省生物农药创制与应用重点实验室/生物防治教育部工程研究中心/

华南农业大学 农学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】对 29 株虫生真菌菌株进行分类学鉴定并筛选出对烟粉虱 *Bemisia tabaci* 具有高毒力的菌株。【方法】采用形态学及 ITS 区、TEF 区、Bloc 区基因序列相似性分析鉴定菌株, 并采用浸渍法测定真菌对烟粉虱的毒力。【结果】29 株虫生真菌有 26 株符合白僵菌 *Beauveria* 的特征, 菌株 SB003、SP665 和 SP670 被鉴定属于棒束孢属 *Isaria*; 利用 TEF 区序列、Bloc 区序列、TEF-Bloc 联合序列构建的系统发育树, 结果显示 29 株菌株共包括 24 株球孢白僵菌 *B. bassiana*、2 株假性球孢白僵菌 *B. pseudobassiana* 和 3 株环链棒束孢 *I. cateinannulata*。烟粉虱 2 龄若虫的死亡率随孢子浓度的增加而增加, 不同菌株致病力不同; 用 1×10^8 mL⁻¹ 的孢子悬浮液处理烟粉虱 2 龄若虫 7 d, 致死率最高的菌株为 SP433, 其次为 SB009, 分别为 87.37% 和 82.93%。【结论】本研究可为虫生真菌的分类提供理论基础, 筛选出的高致病力菌株 SP433 和 SB009 可为烟粉虱的生物防治提供参考。

关键词: 虫生真菌; 形态鉴定; 分子鉴定; 烟粉虱; 致病力
中图分类号: S476.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2020)04-0057-11

Identification of 29 strains of entomogenous fungi and their toxicity to *Bemisia tabaci*

CHEN Zhongqin[†], LIANG Wenlong[†], HUANG Liping, SHEN Binbin

(Key Laboratory of Bio-Pesticide Innovation and Application of Guangdong Province/Engineering Research Center of Biological Control, Ministry of Education/College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To identify 29 strains of entomogenous fungi and select high virulent strains against *Bemisia tabaci*. 【Method】Identification of fungi were based on morphological analysis and genetic homology analysis of sequences in ITS, TEF and Bloc regions. The fungal toxicity to *B. tabaci* was evaluated by the immersion method. 【Result】Twenty-six of 29 entomogenous fungal strains had the characteristics of *Beauveria* and the other three strains of SB003, SP665 and SP670 were identified as *Isaria*. Phylogenetic tree was constructed using TEF region sequence, Bloc region sequence and TEF-Bloc combined sequence, which showed that 29 strains included 24 strains of *Beauveria bassiana*, 2 strains of *B. pseudobassiana*, and 3 strains of *Isaria cateinannulata*. The mortality of the 2nd instar nymph of *B. tabaci* increased with the increase of spore concentration, and the pathogenicity of different strain was different. The 2nd instar nymphs of *B. tabaci* were

treated with 1×10^8 mL⁻¹ spore suspension for 7 days, and the SP433 strain had the highest lethality rate of 87.37%, followed by SB009 with a lethality rate of 82.93%. 【Conclusion】 This study can provide a theoretical basis for the classification of entomophytic fungi. The highly pathogenic strains of SP433 and SB009 were screened out, which can provide a reference for the biological control of *B. tabaci*.

Key words: entomopathogenic; morphological identification; molecular identification; *Bemisia tabaci*; virulence

虫生真菌是一类重要的生物资源，也是生态系统的重要组成部分，其寄主广泛，包括半翅目的蚜科、飞虱科、叶蝉科、沫蝉科、粉虱科和盲蝽科，鳞翅目、鞘翅目、双翅目和缨翅目等昆虫^[1]。虫生真菌以种类多、安全有效、应用期长、不伤害天敌、不易产生抗性并能快速大量生产等优点著称，在生物防治中有着无可比拟的反复侵染性和生产便利性^[2]。白僵菌 *Beauveria* 寄主范围广泛，包括重要的农业和森林害虫^[3-5]、病媒介昆虫^[6-7] 和蜱螨类^[8]，易培养，且对温血动物和植物无害，另外，不仅对成虫治病力强，还能侵染幼虫、蛹、成虫等虫态，对下一代有持续作用^[9-10]。

烟粉虱 *Bemisia tabaci* 属于半翅目 Homoptera 粉虱科 Aleyrodidae 小粉虱属 *Bemisia*，是重要的农业害虫之一，可通过直接刺吸及有效传播病毒而对作物造成损伤^[11-13]。成虫高度杂食性，侵染 1 000 多种植物，并可传播菜豆金色黄花叶病毒属 *Begomovirus*、毛形病毒属 *Crinivirus*、香石竹潜隐病毒属 *Carlavirus*、番茄托拉多病毒属 *Torradovirus* 和甘薯病毒属 *Ipomovirus* 等 300 多种病毒，造成的经济损失每年达数 10 亿美元^[14-15]。烟粉虱若虫拥有蜡质外壳，常固定吸附在作物表面，仅以刺吸式口器危害作物，化学杀虫剂很难渗入其体内，为了达到防治效果往往加大药量，这样不但增加经济成本而且污染环境，还会提高害虫的抗药性^[16]。目前烟粉虱对除虫菊酯类、有机磷类等杀虫剂均已产生了较为强烈的抗药性^[17]，因此，研究有效的烟粉虱生物防治技术尤为重要。

本研究以华南农业大学生物防治教育部工程研究中心保存的 29 株菌株为研究对象，对菌株进行形态学及分子生物学分类鉴定，测定不同菌株对烟粉虱的室内致病力，最终筛选出致病力较强的优良菌株，以期对烟粉虱防治提供后备的生产菌株。

1 材料与方法

1.1 供试材料

虫生真菌共计 29 株，均为华南农业大学生物

防治教育部工程研究中心继代保存的菌株。具体信息详见表 1。

棉花“鲁棉研 32 号”购自山东省潍坊市种子管理站。自然条件下，用经高压灭菌的营养土钵栽培棉花种子，生长期间棉花苗置于干净的养虫笼 (60 cm×60 cm×60 cm) 内，待苗长至 6~8 叶期时用于试验。

B 型烟粉虱种群 2005 年采自华南农业大学教学实习农场，寄主植物为番茄。采回后烟粉虱被隔离饲养在生物防治教育部工程研究中心的棉花寄主上继代繁殖。饲养条件为温度 (27±1)℃，光周期为 14 h 光:10 h 暗，相对湿度 (75±5)%。

Ezup 柱试真菌基因组 DNA 抽提试剂盒 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司]、吐温-80(φ 为 0.05%)、95%(φ) 乙醇溶液、75%(φ) 乙醇溶液、葡萄糖、琼脂糖、戊二醛、丙酮、磷酸缓冲液、DL2000 DNA Marker。

1.2 方法

1.2.1 虫生真菌的形态学鉴定 将菌株转接到新的 PDA 培养皿 25℃ 条件下培养 3~5 d，取菌丝分布均匀的供试菌一皿，用直径 1.5 cm 的打孔器打菌饼，将菌饼置于 PDA 平板中央进行接种，25℃ 光照培养箱内培养。用十字交叉法，分别于第 3、5、7、9 和 10 天测定各菌株的纵横菌落直径，每株重复测定 5~6 个皿，以加入无菌水的 PDA 培养基作为对照。同时，10 d 后用相机拍摄菌落正反面。

将上一步骤培养 10 d 形成的菌落全部置于 50 mL 0.05%(φ) 的吐温-80 溶液中，充分振荡，取 200 μ L 孢子悬浮液，在血球计数板上镜检各菌株的孢子萌发情况。每处理重复 3 次，以加入无菌水的液体培养基作为空白对照。菌株产孢量计算公式为：

$$1\text{ cm}^2\text{ 菌株产孢量}=(\text{平均每小格孢子数}\times4\times10^6\times\text{稀释倍数})/(3.14\times0.09)。$$

进行孢子的扫描电镜观察。

1.2.2 虫生真菌的分子生物学鉴定 用 Ezup 柱试真菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取总 DNA。

表 1 供试菌株信息
Table 1 Information of test strains

菌株 Strain	采样地 Sampling place	采样时间 Sampling time
SB003	湖北省神农架林区 Shennongjia forest area, Hubei Province	2007-07
SB004	甘肃省天水市麦草沟自然保护区	2007-08
	Maicaogou nature reserve, Tianshui, Gansu Province	
SB006	甘肃省临夏回族自治州莲花山自然保护区	2007-08
	Lianhuashan nature reserve, Linxia Hui Autonomous Region, Gansu Province	
SB009	四川省成都市青羊区文殊院 Wenshuyuan, Qingyang district, Chengdu, Sichuan Province	2007-10
SB010	云南省昆明市 Kunming, Yunnan Province	2007-09
SB015	河南省鹤壁市 Hebi, Henan Province	2007-10
SB026	四川省雅安市宝兴县蜂桶寨	2007-07
	Fengtong village, Baoxing county, Ya'an, Sichuan Province	
SB032	韩国济州岛天地渊瀑布 Tiandiyuan waterfall, Jeju Island, South Korea	2008-07
SB035	云南省红河州石屏县 Shiping county, Honghe Prefecture, Yunnan Province	2009-05
SB036	内蒙古自治区呼伦贝尔市新巴尔虎左旗	2009-08
	Xinbalhuzuoqi, Hulunbuir, Inner Mongolia Autonomous Region	
SB037	内蒙古自治区兴安盟扎赉特旗	2009-08
	Zhalaitqi, Xing'an League, Inner Mongolia Autonomous Region	
SB038	内蒙古自治区锡林郭勒盟正镶白旗	2009-08
	Zhengxiangbaiqi, Xilinguole League, Inner Mongolia Autonomous Region	
SB039	内蒙古自治区阿拉善盟贺兰山国家级自然保护区	2009-08
	Helan Mountain National Nature Reserve, Alxa League, Inner Mongolia Autonomous Region	
SB041	内蒙古自治区锡林郭勒盟正镶白旗	2009-08
	Zhengxiangbaiqi, Xilinguole League, Inner Mongolia Autonomous Region	
SB043	西藏自治区林芝市波密县古乡	2009-09
	Gu village, Bomi county, Linzhi, Tibet Autonomous Region	
SB050	广东省广州市白云山 Baiyun Mountain, Guangzhou, Guangdong Province	2009-10
SB051	广东省河源市龙川县 Longchuan county, Heyuan, Guangdong Province	2010-05
SB057	贵州省雷山县方祥乡 Fangxiang village, Leishan county, Guizhou Province	2010-07
SB062	内蒙古自治区阿拉善盟古拉本敖包镇	2010-08
	Gulaben Aobao Town, Alxa League, Inner Mongolia Autonomous Region	
SB063	内蒙古自治区阿拉善盟贺兰山脉中部哈拉乌	2010-08
	Harau, central Helan Mountain, Inner Mongolia Autonomous Region	
SB671	云南省镇沅彝族哈尼族拉祜族自治县	2009-10
	Zhenyuan Yi Hani Lahu Autonomous county, Yunnan Province	
SB672	福建省厦门市鼓浪屿 Gulangyu, Xiamen, Fujian Province	2010-09
SB673	云南省迪庆州维西县保和镇 Baohe town, Weixi county, Diqing Prefecture, Yunnan Province	2010-09
SB674	广东省广州市华南农业大学林学与风景园林学院	2010-10
	College of forestry and landscape architecture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong Province	
SP016	湖北省神农架林区老君山 Laojun Mountain, Shennongjia forest area, Hubei Province	2007-08
SP031	甘肃省张掖市肃南县东柳沟 Dongliugou, Sunan county, Zhangye, Gansu Province	2007-08
SP433	内蒙古自治区呼伦贝尔市牙克石市	2009-08
	Yakeshi, Hulunbuir, Inner Mongolia Autonomous Region	
SP665	云南省楚雄彝族自治州峨绿公园西灵宫	2009-09
	Xiling Palace, Erlu Park, Chuxiong Yi Autonomous Prefecture, Yunnan Province	
SP670	湖北省宜昌市蛤蟆泉 Toad Spring, Yichang, Hubei Province	2009-10

ITS 序列、Bloc 序列、TEF 序列的 PCR 扩增均采用通用引物, 详细引物信息见表 2。PCR 反应体系为 25 μ L 体系, 其中 ddH₂O 10 μ L, 2 $\times$ Taq PCR StarMix 12 μ L, 上下游引物各 1 μ L, DNA 模板 1 μ L。ITS 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。Bloc 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 80 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 min。TEF 扩增条件:

TEF 采用降落 PCR 的扩增方式, 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 66 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 每个循环退火温度降低 1 $^{\circ}$ C, 11 个循环; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将目的条带大小合适样品的纯化回收产物送上海美吉生物医药科技有限公司进行序列测定。利用软件 Geneious 进行序列拼接, 进行 Blast 序列相似性搜索, 采用软件 MEGA 7.0 构建系统进化树。

表 2 虫生真菌 DNA 的 PCR 扩增引物
Table 2 PCR amplification primers for entomogenous fungal DNA

基因序列 Gene sequence	引物 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequence
ITS	ITS4F	TCCTCCGCTTATTGATATGC
	ITS5R	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
Bloc	B5.1F	CGACCCGGCCAACACTACTTTGA
	B3.1R	GTCTTCCAGTACCACTACGCC
TEF	983F	GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT
	2218R	ATGACACCRACRGCACRGTGTG

1.2.3 虫生真菌对烟粉虱的毒力测定 在 PDA 平板上培养 7 d 后, 充分产孢的虫生真菌分生孢子用 0.05%(φ) 吐温-80 无菌水洗脱, 搅拌, 充分振荡, 过滤, 用血球计数板计数, 测量母液的浓度, 配制成 1×10^8 mL⁻¹ 的孢子悬浮液, 再稀释成 1×10^7 mL⁻¹ 的孢子悬浮液备用。

将带有烟粉虱 2 龄若虫的棉花叶片背面浸于配好的孢子悬浮液中, 30 s 后取出, 待叶片自然晾干后, 将叶片背面朝上置于琼脂培养基中, 用保鲜膜封口并扎孔通气, 将培养皿倾斜放置, 置于人工气候箱中, 饲养条件为温度 (27 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C, 光周期 14 h 光:10 h 暗, 相对湿度 (75 $\pm$ 5)%。以 0.05%(φ) 吐温-80 无菌水为空白对照。每个处理重复 4 次, 每个重复 100 头若虫。于 7 d 后检查烟粉虱的死亡情况并记录死亡数, 计算死亡率。

1.3 数据处理

采用 SPSS17.0 与 Excel 软件进行数据处理及统计分析, Duncan's 进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 虫生真菌的形态学观察

2.1.1 虫生真菌的菌落形态 培养第 10 天分别观察及拍摄 PDA 培养基上各菌株菌落的正面及背面形态图 (图 1)。

菌株 SB003 菌落呈白色, 中央气生菌丝突起, 向外气生菌丝减少, 变薄, 背面橘黄色, 培养基平板

不变色 (图 1-1、1-2); 菌株 SB004 菌落呈放射状有褶皱, 中间绒毛状, 背面橘黄色 (图 1-3、1-4); 菌株 SB006 菌落由绒毛状变粉末状, 中间为凸起粉末状 (图 1-5、1-6)。

菌株 SB009 菌落呈绒毛状, 表面白色, 背面橘黄色 (图 1-7、1-8); 菌株 SB010 菌落由绒毛状变粉末状, 背面边缘呈绒毛状, 表面白色, 背面橘黄色 (图 1-9、1-10); 菌株 SB015 菌落由绒毛状变粉末状, 边缘无绒毛, 背面白色或淡黄色, 后期中间凸起厚粉末 (图 1-11、1-12)。

菌株 SB026(图 1-13、1-14) 菌落形态特征同菌株 SB015; 菌株 SB032(图 1-15、1-16)、SB036(图 1-19、1-20)、SB037(图 1-21、1-22)、SB038(图 1-23、1-24) 菌落初期为绒毛状, 中央气生菌丝突起、疏松, 后期中间有凸起厚粉末, 边缘呈绒毛状, 有褶皱, 表面白色或乳白色, 培养基平板不变色, 此外, 菌株 SB037、SB038 菌落有液滴; 菌株 SB035(图 1-17、1-18) 菌落由绒毛状变粉末状, 表面白色, 背面呈橘黄色。

菌株 SB039(图 1-25、1-26)、SB041(图 1-27、1-28) 菌落絮状, 表面白色, 背面淡黄色; 菌株 SB043 培养 10 d 的菌落由绒毛变粉末状, 边缘呈绒毛状, 背面呈淡黄色 (图 1-29、1-30)。

菌株 SB050 菌落由绒毛状变为粉末状, 表面白色, 培养基背面白色或淡黄色 (图 1-31、1-32); 菌株 SB051 菌落前期绒毛状, 后期粉末状, 中间凸起厚

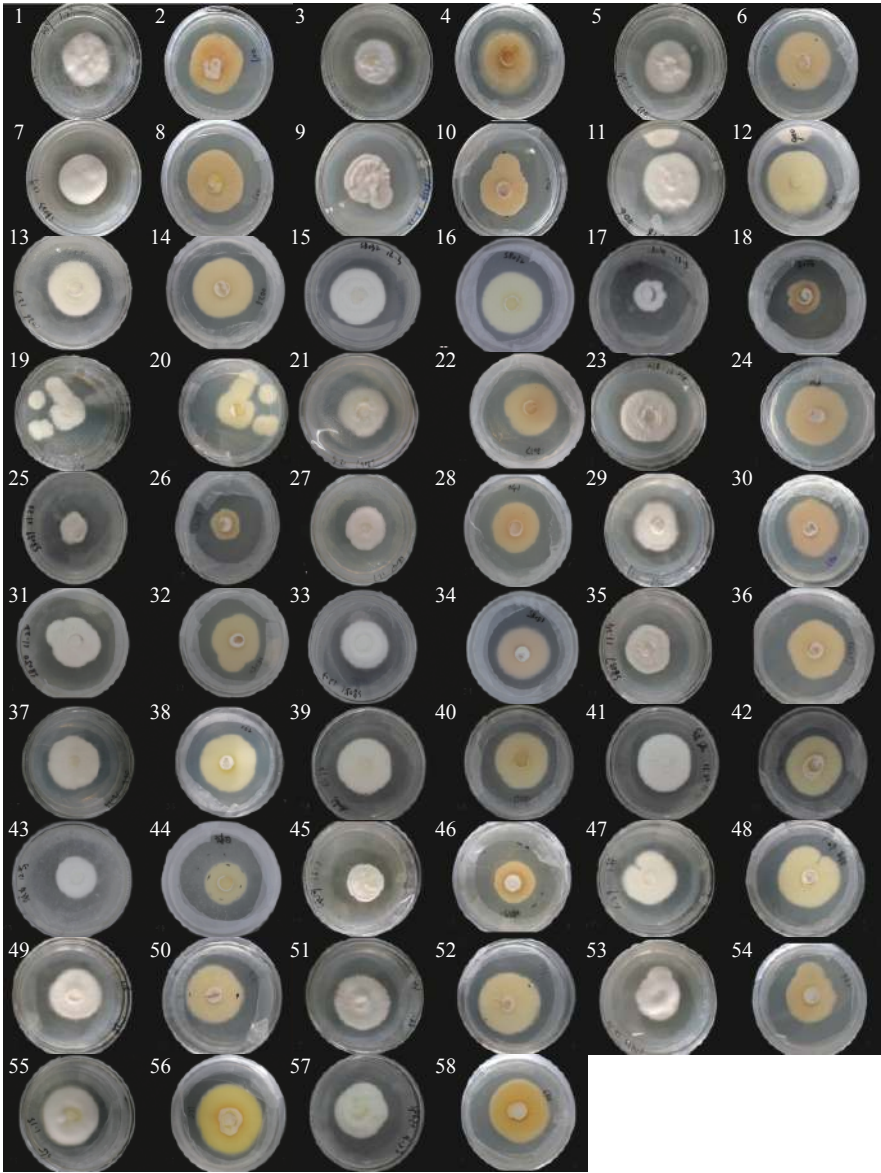
粉末, 边缘呈绒毛状, 菌落放射状, 背面淡黄色 (图 1-33、1-34); 菌株 SB057 菌落由绒毛状变粉末状, 边缘无绒毛, 背面白色或淡黄色 (图 1-35、1-36)。

菌株 SB062(图 1-37、1-38)、SB673(图 1-45、1-46) 菌落形态同 SB032; 菌株 SB063(图 1-39、1-40)、SB671(图 1-41、1-42)、SB672(图 1-43、1-44) 和 SB674(图 1-47、1-48) 菌落形态同 SB050。

菌株 SP016(图 1-49、1-50) 菌落形态同 SB043;

菌株 SP031 菌落中间绒毛状, 表面白色, 背面淡黄色, 边缘绒毛状 (图 1-51、1-52); 菌株 SP433(图 1-53、1-54) 菌落形态同 SB032。

菌株 SP665(图 1-55、1-56)、SP670(图 1-57、1-58) 菌落绒毛状, 中央气生菌丝突起、疏松, 向外气生菌丝减少、变薄, 中部淡黄色, 边缘白色, 背面橘黄色或淡黄色, 培养基平板不变色。



1, 2: SB003; 3, 4: SB004; 5, 6: SB006; 7, 8: SB009; ; 9, 10: SB010; 11, 12: SB015; 13, 14: SB026; 15, 16: SB032; 17, 18: SB035; 19, 20: SB036; 21, 22: SB037; 23, 24: SB038; 25, 26: SB039; 27, 28: SB041; 29, 30: SB043; 31, 32: SB050; 33, 34: SB051; 35, 36: SB057; 37, 38: SB062; 39, 40: SB063; 41, 42: SB671; 43, 44: SB672; 45, 46: SB673; 47, 48: SB674; 49, 50: SP016; 51, 52: SP031; 53, 54: SP433; 55, 56: SP665; 57, 58: SP670

图 1 菌株的菌落形态 (奇数为正面, 偶数为反面)

Fig. 1 Colony morphology of strain(the odd number showed the front and the even number showed the back)

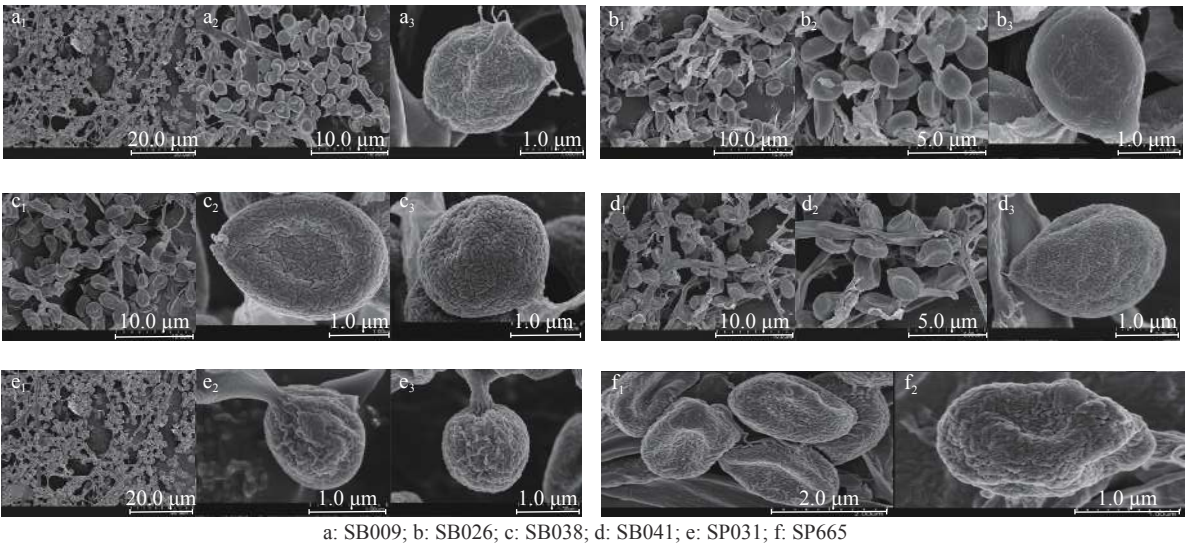
2.1.2 孢子的扫描电镜观察 菌株 SB009 的孢子呈卵形和近球形, 孢子直径 1.8~2.2 μm (图 2a)。菌株 SB026 的孢子呈卵形, 孢子直径 1.8~2.4 μm (图 2b)。菌株 SB038 产孢细胞的基部膨大, 产孢轴“Z”型

弯曲, 分生孢子有球形和卵形, 孢子直径 1.7~2.6 μm (图 2c)。SB041 孢子形状和大小与 SB009 比较类似, 孢子卵形, 部分为近球形, 直径 1.6~2.5 μm (图 2d)。SP031 孢子有球形, 也有椭圆形, 孢子大小

1.3~1.5 μm (图 2e)。SP665 分生孢子梗不规则分枝, 长短不一, 基部拟椭圆形膨大, 变细成明显的颈部。分生孢子球形或椭圆, 孢子直径 1.4~2.2 μm (图 2f)。

2.1.3 菌落生长速率 虫生真菌的各菌落生长速率见图 3, 菌株培养前期 (3 d), 菌株的菌落直径差异不明显, 菌株 SB010 和 SP031 的直径大于 25.0 mm, 菌株 SB038、SB035、SB039 的直径小于 20.0 mm, 其他菌株的菌落直径为 20.8~24.3 mm, 菌株间无明显差异; 随着培养时间的延长, 菌株的菌落直径差异增加, 菌株培养 5 d 时, 菌株 SB010、SB032、SP031、SB006 的菌落直径大于 35.0 mm, 菌株 SB010 的菌落直径最大, 为 37.9 mm, 菌株 SB039

与 SB035 的菌落直径偏小, 不到 25.0 mm; 培养 7 d 时, 菌落直径达 40.0 mm 以上的菌株占供试菌株的一半, 而菌株 SB035 与 SB039 的菌落直径却不到 30.0 mm; 培养 9 d 时, 菌株 SP031、SB010、SB006、SB032、SB671、SB062、SB037、SB672 的菌落直径达 50.0 mm 及以上, 而菌株 SB035 的菌落直径仍不到 30.0 mm; 培养 10 d 时, 菌株 SB010 与 SP031 已达 60.0 mm 以上, 分别为 62.7 和 61.3 mm, 生长速率最快; 菌株 SB041、SB039 和 SB035 的菌落直径不到 40.0 mm, 菌株 SB035 的菌落直径仍为各菌株中菌落直径最小的, 仅有 30.3 mm。



a: SB009; b: SB026; c: SB038; d: SB041; e: SP031; f: SP665

图 2 菌株的孢子结构图
Fig. 2 Spore structure of strain

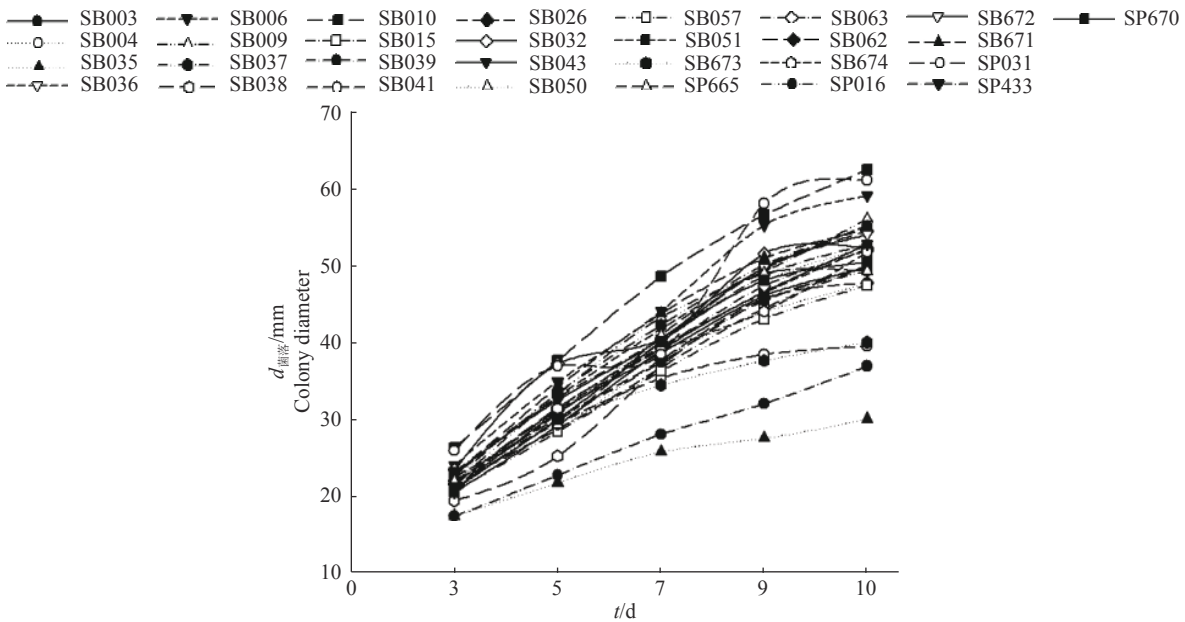


图 3 虫生真菌的菌落生长速率
Fig. 3 The growth rates of entomogenous fungal colonies

2.1.4 菌株产孢量 菌株产孢量见表 3, 29 株虫生真菌的产孢量存在明显差异。其中, 菌株 SB032 产孢量最大, 其次依次分别为 SB039、SB038、SB004、SB006、SB050、SP433、SB036 和 SB043, 产孢量均大于 10^8 mL^{-1} 。产孢量最少的为 SB003 和 SB041, 产孢量不到 $3.50 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 。

2.2 虫生真菌的分子生物学鉴定

将 ITS 区、TEF 区、Bloc 区的序列拼接后去除 ITS4、ITS5、2218R、983F、B5.1F 和 B3.1R 的引物序列, ITS 区的片段为 550~600 bp, TEF 区为 1 000 bp 左右, Bloc 区的片段为 1 500 bp 左右, 在 GenBank 上进行 BLAST 比对, 比对出的相似性最高的菌株结果见表 4, 最终比对得出分别属于球孢白僵菌、假

球孢白僵菌和环链棒束孢。

将供试的 29 株菌株的 ITS 序列、TEF 序列和 Bloc 序列采用最大似然法建树建立系统发育树 (图 4)。ITS 序列构建的系统发育树 (图 4a) 分为 2 大分支, 第 1 分支为假环链棒束孢 ARSEF 6242 与供试菌株 SB003、SP665 和 SP670, 因此可把它们归为环链棒束孢; 第 2 大分支为白僵菌属, 24 株供试菌株与白僵菌属的不同球孢白僵菌类聚, 为球孢白僵菌, 但其中菌株 SB039、SB041 与 Strain E51 类聚 1 分支, 为假球孢白僵菌。

TEF 序列构建的系统发育树 (图 4b) 分为 3 大分支, 第 1 分支为棒束孢所在的分支, 菌株 SB003、SP665 和 SP670 与菌株 ARSEF 6240 类聚, 为环链

表 3 虫生真菌的产孢量¹⁾
Table 3 Spore productions of entomogenous fungi

菌株 Strain	产孢量/($\times 10^7 \text{ mL}^{-1}$) Spore production	菌株 Strain	产孢量/($\times 10^7 \text{ mL}^{-1}$) Spore production	菌株 Strain	产孢量/($\times 10^7 \text{ mL}^{-1}$) Spore production
SB003	3.25±0.59f	SB037	9.86±0.69abcdef	SB671	4.64±0.71ef
SB004	14.27±2.63abc	SB038	14.78±2.06ab	SB672	8.35±1.72abcdef
SB006	13.65±1.59abcd	SB039	16.38±2.83a	SB673	5.15±1.10def
SB009	9.42±1.19abcdef	SB041	3.48±0.47f	SB674	6.61±1.75bcdef
SB010	6.72±1.92bcdef	SB043	11.16±1.48abcdef	SP016	4.04±0.49ef
SB015	8.29±0.74abcdef	SB050	12.64±3.07abcde	SP031	9.32±1.73abcdef
SB026	9.19±1.73abcdef	SB051	6.54±0.47bcdef	SP433	12.54±2.36abcde
SB032	16.56±1.59a	SB057	9.30±0.37abcdef	SP665	5.57±0.89cdef
SB035	3.84±0.56ef	SB062	6.02±1.76bcdef	SP670	7.26±0.49bcdef
SB036	11.23±2.66abcdef	SB063	7.88±1.59abcdef		

1)数据后不同小写字母者表示不同菌株间菌落产孢量差异显著($P<0.05$, Duncan’s法)
1) Different lowercase letters indicate significant differences in spore production among different strains ($P<0.05$, Duncan’s test)

表 4 供试菌株 ITS 区、TEF 区和 Bloc 区的序列比对结果
Table 4 Results of comparing the ITS regions, TEF regions and Bloc regions of test strains

真菌 Fungus	菌株登录号 Accession number of strain		
	ITS区 ITS region	TEF区 TEF region	Bloc区 Bloc region
球孢白僵菌 <i>Beauveria bassiana</i>	KX901309	JQ867178	JQ867116
球孢白僵菌 <i>B. bassiana</i>	AY531976	JQ867172	JQ867106
球孢白僵菌 <i>B. bassiana</i>	KX901310	JQ867171	JQ867109
球孢白僵菌 <i>B. bassiana</i>	GU233705	JQ867157	JQ867118
球孢白僵菌 <i>B. bassiana</i>	GU233701	JQ867151	JQ867125
球孢白僵菌 <i>B. bassiana</i>		AY883691	AY883788
球孢白僵菌 <i>B. bassiana</i>		KU725693	KU725706
假球孢白僵菌 <i>Beauveria pseudobassiana</i>	MH259852	HQ880999	HQ880727
假球孢白僵菌 <i>B. pseudobassiana</i>		LC163567	LC163595
环链棒束孢 <i>Isaria cateniannulata</i>	GU734760	GU734758	

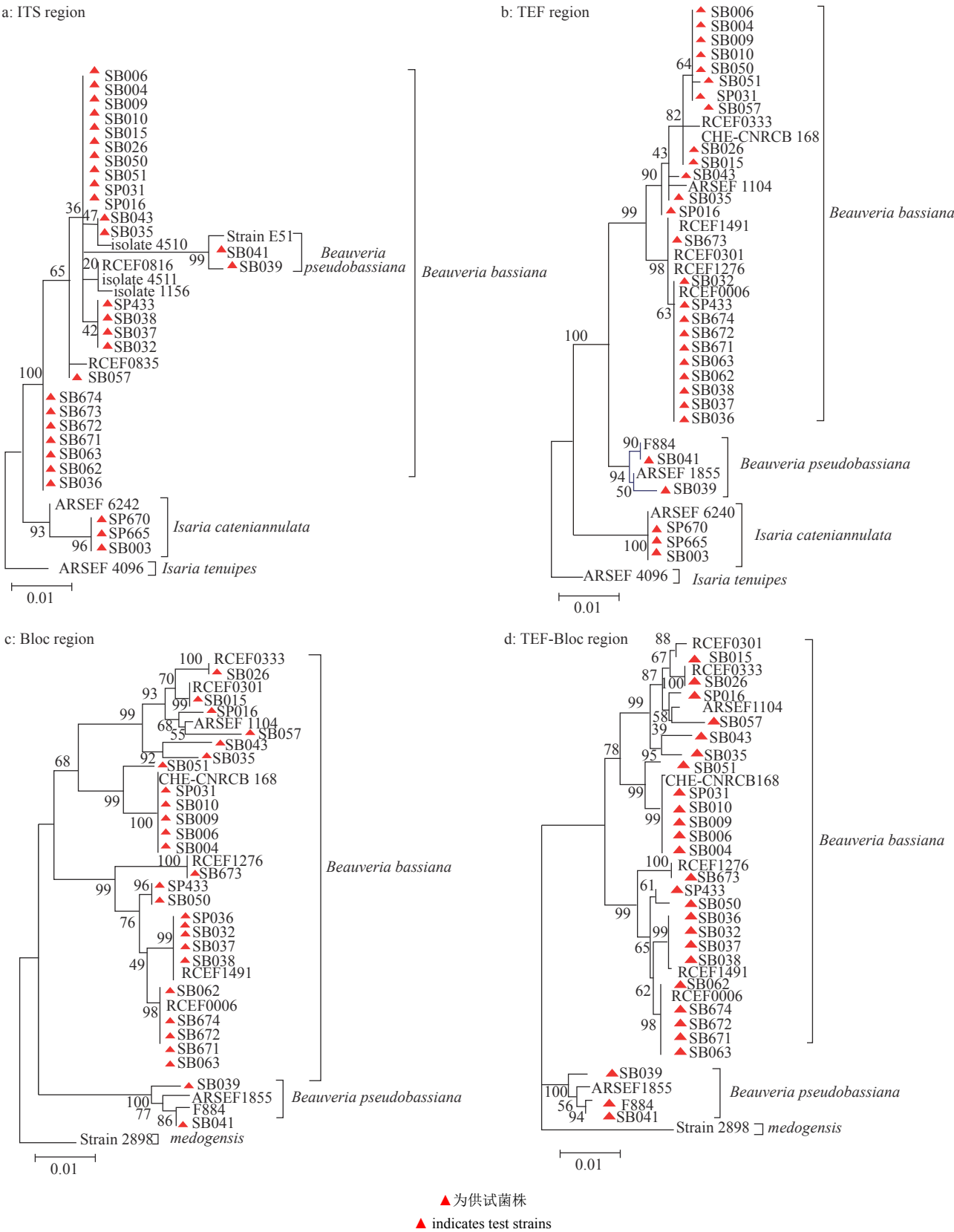


图 4 基于不同序列以最大似然法构建的真菌系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of fungi constructed using the maximum likelihood method and based on different sequences

棒束孢;第 2 分支由菌株 F884、ARSEF 1855、1276、RCEF 0301、RCEF1491、RCEF0333、ARSEF
SB039 和 SB041 组成,为假球孢白僵菌;第 3 分支 1104 和 CHE-CNRCB 168 组成,为球孢白僵菌。
由供试的 24 株菌株和菌株 RCEF 0006、RCEF SP665、SP670 和 SB003 的 Bloc 区未能扩增成

功。Bloc 序列构建的系统发育树 (图 4c) 分为 2 大分支, 第 1 分支为假球孢白僵菌 ARSEF 1855、F884 所在分支, 与该种类聚的也是菌株 SB039 和 SB041; 第 2 分支分由 3 个小分支构成, 为球孢白僵菌。各种间的自展支持率基本大于 50%。

TEF-Bloc 序列构建的系统发育树 (图 4d) 与单基因 Bloc 序列构建的发育树很相似, 自展支持率不一样, 但供试菌株与各菌种的类聚位置一致。

2.3 虫生真菌对烟粉虱的毒力测定

不同浓度的各菌株孢子悬浮液对烟粉虱 2 龄若虫的 7 d 毒力测定结果见表 5, 各菌株在同一处理时

间下, 致死率存在差异。当孢子悬浮液为 1×10^7 mL⁻¹ 时, 菌株 SB039 的致死率最高 (72.77%), 其次是 SP433 菌株 (69.03%); 当孢子悬浮液为 1×10^8 mL⁻¹ 时, 菌株 SP433、SB009、SB050、SB036、SB043 的致死率达 80% 以上, 菌株 SP433 的致死率最高 (87.37%), 致死率最小的是菌株 SP031(52.85%)。同一菌株不同浓度, 致死率随着孢子悬浮液浓度的增加而升高, 而菌株 SB039、SB063、SP031、SP670、SB671、SB035 在孢子悬浮液为 1×10^7 和 1×10^8 mL⁻¹ 下处理烟粉虱若虫 7 d 后得到相似的致死率。

表 5 不同浓度的孢子悬浮液处理烟粉虱 2 龄若虫 7 d 的死亡率¹⁾

Table 5 Mortality of the 2nd instar nymphs of <i>Bemisia tabaci</i> infected with spore suspensions of different concentrations for 7 days						%		
菌株 Strain	1×10^7 mL ⁻¹	1×10^8 mL ⁻¹	菌株 Strain	1×10^7 mL ⁻¹	1×10^8 mL ⁻¹	菌株 Strain	1×10^7 mL ⁻¹	1×10^8 mL ⁻¹
CK	9.43±0.58d	11.73±2.00d	SB043	47.67±4.00abc	80.33±3.93ab	SB043	47.67±4.00abc	80.33±3.93ab
SB003	56.43±3.45abc	60.06±2.68bc	SB050	49.47±1.47abc	81.30±4.86ab	SB050	49.47±1.47abc	81.30±4.86ab
SB004	55.23±5.85abc	75.23±5.49abc	SB051	59.67±4.17abc	70.87±5.90abc	SB051	59.67±4.17abc	70.87±5.90abc
SB006	51.03±0.54abc	72.33±6.90abc	SB057	51.67±3.55abc	76.00±2.34abc	SB057	51.67±3.55abc	76.00±2.34abc
SB009	67.93±1.68ab	82.93±2.88ab	SB062	35.81±3.54c	63.34±3.93abc	SB062	35.81±3.54c	63.34±3.93abc
SB010	47.90±4.42abc	70.20±4.94abc	SB063	68.03±5.46ab	71.40±2.03abc	SB063	68.03±5.46ab	71.40±2.03abc
SB015	64.30±7.27ab	77.07±4.95abc	SB671	59.80±1.12abc	59.50±9.22bc	SB671	59.80±1.12abc	59.50±9.22bc
SB026	51.77±4.15abc	67.80±3.0abc	SB672	44.67±6.17bc	62.43±7.28bc	SB672	44.67±6.17bc	62.43±7.28bc
SB032	56.57±2.95abc	77.69±3.88ab	SB673	53.23±5.62abc	70.53±2.57abc	SB673	53.23±5.62abc	70.53±2.57abc
SB035	53.07±2.37abc	59.99±2.77bc	SB674	67.20±7.04ab	77.20±2.70abc	SB674	67.20±7.04ab	77.20±2.70abc
SB036	55.33±6.36abc	80.67±4.41ab	SP016	54.47±8.25abc	72.07±4.82abc	SP016	54.47±8.25abc	72.07±4.82abc
SB037	50.17±7.69abc	74.00±3.21abc	SP031	49.43±2.13abc	52.85±1.00c	SP031	49.43±2.13abc	52.85±1.00c
SB038	48.03±6.08abc	70.87±5.90abc	SP433	69.03±3.76ab	87.37±0.43a	SP433	69.03±3.76ab	87.37±0.43a
SB039	72.77±2.14a	73.13±5.20abc	SP665	49.70±4.65abc	64.90±3.26abc	SP665	49.70±4.65abc	64.90±3.26abc
SB041	50.33±4.36abc	70.33±5.42abc	SP670	65.77±0.50ab	72.40±1.56abc	SP670	65.77±0.50ab	72.40±1.56abc

1)相同浓度数据后不同小写字母者表示不同菌株间致病力差异显著($P<0.05$, Duncan's法)
1)Different lowercase letters after data at the same concentration indicate significant differences in pathogenicity among different strains ($P<0.05$, Duncan's test)

3 讨论与结论

对本实验室长期保存的 29 株虫生真菌进行了形态学与分子生物学鉴定。供试的 29 株真菌菌株间的菌落直径、产孢量、孢子结构存在一定差异, 菌株形态与以前描述相符, 但菌株的形态特征存在交叉现象, 不易区分。同一种分生孢子的大小或菌株形态在培养中会发生一定的变化^[18]。在分子鉴定中, 用 ITS 区序列鉴定白僵菌属内各种的效果不理想, ITS 区序列的一致性程度很高, 用 ITS 区序列单独建系统发育树时, 我们发现供试菌株在系统发育树中不能以种为分支各个分开而是呈现交叉状态,

对于需严格区分不同种或不常见的白僵菌的效果不理想, 因此需要引入其他辅助基因序列^[19] 进行研究, 而有报道称白僵菌属内有些种的 TEF 序列对比差异太小会导致难以区分、分类结果错误等问题^[20-22], 因此多基因位点分析在近年来有成为研究物种差异主要方法的趋势。张云月等^[23] 鉴定白僵菌时, 用 ITS 序列建构系统树时也出现了菌属内各种与球孢白僵菌系统交叉的现象, 另外, 他们还引入了 β -tubulin 序列, 但也没能很好地区分白僵菌内种, 验证了 ITS 序列用于白僵菌属内种分类的效果不理想。芦俊佳等^[24] 鉴定楚雄腮扁叶蜂寄生真菌时, 用 ITS 序

列比对时,发现相似性太高,也不能对菌株的分类做出正确的界定,又对其 18 S 序列进行了扩增,最终确定了菌株的分类位置。白僵菌属内种的菌株鉴定是否也可以采用 ITS 和 18S 序列来解决需要进一步的试验验证。

我们将 TEF 区、Bloc 区的序列及 TEF-Bloc 联合序列构建系统发育树,运用了最大似然法构建系统发育树,结果显示 29 株菌株共包括 24 株球孢白僵菌、2 株假性球孢白僵菌和 3 株环链棒束孢。另外,菌株 SB003、SP670 和 SP655 在 Bloc 区没能扩增出来,出现这种情况的原因还有待进一步的试验验证。分子生物学逐渐成为真菌鉴定的辅助手段,但分子生物学方法也会受基因库的完善程度、基因库中高度同源性系列的多少以及具体物种 ITS 区的可变程度等因素的影响^[25-28]。球孢白僵菌在自然环境中的遗传变异较为广泛,且影响因素很多。从系统发育树来看,与地域环境的影响也有关,如在 TEF-Bloc 联合构建的系统发育树中,SB036、SB038 和 SB037 聚在同一小支,而它们的采集地都是在内蒙古自治区内;3 株从甘肃省采集的菌株 SB006、SB004 和 SP031 在 ITS、TEF-Bloc 的系统发育树都聚在同一支。但来自同一省份采集地却并不都聚在同一小分支,如 SB010、SB035、SB671、SB673 都采集于云南省,但在 TEF-Bloc 联合构建的系统发育树上,上述 4 株菌株各自属于不同的 4 个小分支。这与方志刚等^[29]对不同球孢白僵菌菌株进行地区来源与遗传多样性分析得到的结果类似。

本试验结果显示,菌株 SP433 和 SB009 在烟粉虱防治中具有很高的应用潜力。在本研究中,在孢子悬浮液 10^8 mL^{-1} 处理 7 d,烟粉虱的死亡率为 52.85%~87.37%,王慧^[30]研究白僵菌对烟粉虱若虫的侵染效果,在孢子悬浮液 10^8 mL^{-1} 处理 10 d 后,烟粉虱的死亡率为 52.85%~87.37%;吴乾兴等^[31]研究球孢白僵菌对烟粉虱若虫的侵染效果,在孢子悬浮液 10^8 mL^{-1} 处理 6 d 的烟粉虱死亡率为 61.2%~87.9%;以上结果表明,同种的不同菌株可能有不同的致病效果。已有研究通过白僵菌侵染生长动力学试验证实影响毒力差异的一大重要因素是菌体增殖能力不同^[32],另外还可能与采集地点、菌株保存时间、菌株分离对象等有关。

研究白僵菌联合其他杀虫剂或寄生昆虫进行联合防治是研究的热点,银航等^[33]使用球孢白僵菌与保幼激素联用,可显著提高对花椒蚜虫的致死率;张爽等^[34]使用苏云金杆菌和球孢白僵菌复配来

提高对小菜蛾幼虫的杀伤力;杨芷等^[35]利用赤眼蜂搭载球孢白僵菌对亚洲玉米螟进行协同防控。未来白僵菌的应用范围将更加广泛、方法将更加多样,如何有效利用我们筛选出的高致病力的菌株还有待进一步的研究。

参考文献:

[1] 查岭生,文庭池,KEVIN D H, et al. 中国虫霉目真菌及其寄主昆虫名录更新[J]. 菌物学报, 2016, 35(6): 666-683.

[2] 阙生全,喻爱林,刘亚军,等. 白僵菌应用研究进展[J]. 中国森林病虫, 2019, 38(2): 29-35.

[3] 蒲蛰龙,李增智. 昆虫真菌学[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1996: 402-715.

[4] WRIGHT M S, LAX A R. Improved mortality of the Formosan subterranean termite by fungi, when amended with cuticle-degrading enzymes or eicosanoid biosynthesis inhibitors[J]. Folia Microbiol, 2016, 61(1): 73-83.

[5] HEINIG R L, PAAIJMANS K P, HANCOCK P A, et al. The potential for fungal biopesticides to reduce malaria transmission under diverse environmental conditions[J]. J Appl Ecol, 2015, 52(6): 1558-1566.

[6] 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.

[7] 辛正,张晓,刘慧媛,等. 白僵菌在蟑螂防治中的研究进展[J]. 中华卫生杀虫药械, 2017, 23(5): 401-406.

[8] SUN M, REN Q, GUAN G, et al. Eectiveness of Beauveria bassiana sensu lato strains for biological control against Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) in China[J]. Parasitol Int, 2013, 62(5): 412-415.

[9] CHEN W, HASEGAWA D D, KAUR N, et al. The draft genome of whitefly Bemisia tabaci MEAM1, a global crop pest, provides novel insights into virus transmission, host adaptation, and insecticide resistance[J]. BMC Biol, 2016, 14(1): 110.

[10] CHEN M J, HUANG B, LI Z Z, et al. Morphological and genetic characterisation of Beauveria sinensis sp. nov. from China[J]. Mycotaxon, 2013, 124(1): 301-308.

[11] KESSIA F C, PANTOJA, KELLY C G, et al. Identification of Capsicum accessions to lerantto Tomato severe rugose virus and resistant to Bemisia tabaci Middle East-Asia Minor1(MEAM1)[J]. Trop Plant Pathol, 2018, 43(2): 138-145.

[12] 李英梅,杨苗苗,刘晨,等. 杀虫剂对烟粉虱传番茄黄化曲叶病毒病的防控效果[J]. 西北农业学报, 2019, 28(3): 466-474.

[13] JURAJ M, JAROSLAV M, JANKA M, et al. Phylogenetic structure and habitat associations of Beauveria species isolated from soils in Slovakia[J]. J Invertebr Pathol, 2016, 140: 46-50.

[14] 潘李隆,迟瑶,范运运,等. 烟粉虱对菜豆金黄花叶病毒属病毒的传播:病毒对媒介昆虫的适应[J]. 昆虫学报,

2019, 62(7): 885-894.

[15] GILBERTSON R L, BATUMAN O, WEBSTER C G, et al. Role of the insect supervectors *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis* in the emergence and global spread of plant viruses[J]. *Annu Rev Virol*, 2015, 2(1): 67-93.

[16] ABDESSAMAD I, MUZAMMIL H, PAUL M, et al. Entomopathogenic fungus *Beauveria*: Host specificity, ecology and significance of morpho-molecular characterization in accurate taxonomic classification[J]. *J Asia-Pac Entomol*, 2017, 20(4): 1204-1212.

[17] 褚栋, 张友军. 近 10 年我国烟粉虱发生为害及防治研究进展[J]. *植物保护*, 2018, 44(5): 51-55.

[18] 郭东升, 翟颖妍, 任广伟, 等. 白僵菌属分类研究进展[J]. *西北农业学报*, 2019, 28(4): 497-509.

[19] 余垚颖, 郭应菊, 杨雪, 等. 我国虫生真菌的研究现状[J]. *四川农业科技*, 2018(12): 27-29.

[20] REHNER S A, BUCKLEY E P. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: Evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps teleomorphs*[J]. *Mycologia*, 2005, 97: 84-98.

[21] REHNER S A, MINNIS A M, SUNG G H, et al. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*[J]. *Mycologia*, 2011, 103: 1055-1073.

[22] MEYLING N V, PILZ C, KELLER S, et al. Diversity of *Beauveria* spp. isolates from pollen beetles *Meligethes aeneus* in Switzerland[J]. *J Invertebr Pathol*, 2012, 109: 76-82.

[23] 张云月, 张军, 李丽莉, 等. 球孢白僵菌有性世代培养及子代毒力稳定性鉴定[J]. *中国生物防治学报*, 2017, 33(3): 364-370.

[24] 芦俊佳, 夏举飞, 庄飞, 等. 楚雄腮扁叶蜂虫生真菌粉红粘帚霉的鉴定及其生物学特性[J]. *植物保护学报*, 2018, 45(3): 622-631.

[25] 杨帆, 曹涵铭, 陈园园, 等. AM 真菌结构及鉴定方法的研究进展[J]. *现代农业科技*, 2019(16): 152-154.

[26] 张伟铮, 关文苑, 李松, 等. ITS 序列分析与 MALDI-TOF MS 质谱技术在丝状真菌鉴定中的应用[J]. *菌物学报*, 2019, 38(8): 1298-1305.

[27] 甘森宁, 陆梅颖, 肖志邦, 等. 植物内生真菌的分类鉴定方法[J]. *安徽农学通报*, 2019, 25(10): 36-37.

[28] 李美君, 白庆荣, 臧连生, 等. 水稻二化螟病原真菌鉴定及其致病力[J]. *中国生物防治学报*, 2019, 35(1): 63-69.

[29] 方志刚, 张立钦, 林新春. 不同球孢白僵菌菌株 DNA 的 RAPD 分析[J]. *南京林业大学学报 (自然科学版)*, 2001, 25(4): 65-68.

[30] 王慧. 绿僵菌和白僵菌不同菌株对烟粉虱若虫的致病力及应用研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2013.

[31] 吴乾兴, 刘勇, 张友军, 等. 烟粉虱常用药剂抗性监测研究[J]. *现代农业科技*, 2018(2): 119-120.

[32] 王登杰, 王海鸿, 张桃, 等. 三株球孢白僵菌侵染烟粉虱的比较生长动力学及其毒力[J]. *菌物学报*, 2016, 35(5): 577-585.

[33] 银航, 窦雪绒, 张云霞, 等. 球孢白僵菌、保幼激素联用防治花椒蚜虫[J]. *陕西农业科学*, 2019, 65(11): 57-61.

[34] 张爽, 杨佳利, 马军, 等. 苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 与球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 复配对小菜蛾幼虫 (*Plutella xylostella*) 的影响研究[J]. *生物灾害科学*, 2017, 40(4): 288-291.

[35] 杨芷, 路杨, 毛刚, 等. 赤眼蜂携带球孢白僵菌防治亚洲玉米螟技术研究与应用[J/OL]. *中国生物防治学报*, 2019. doi: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2019.05.011.

【责任编辑 霍 欢】