应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2014, 51(2): 554–561. DOI: 10.7679/j.issn.2095–1353.2014.065

脐腹小蠹高致病力虫生真菌菌株的筛选*

范丽华[1**] 牛辉林[2] 张金桐[1***] 刘金龙[1] 杨美红[1] 宗世祥[3]

（1. 山西农业大学文理学院化学生态研究所 太谷 030801；2. 宁夏哈巴湖国家级自然保护区管理局高沙窝管理站 盐池 751501；

3. 北京林业大学省部建森林培育与保护教育部重点实验室 北京 100083）

摘 要 **【目的】** 脐腹小蠹 *Scolytus schevyrewi* Semenov 是白榆的钻蛀性害虫之一，为找到对脐腹小蠹的高致病力虫生真菌菌株。**【方法】** 通过室内喷雾法研究了 5 株虫生真菌菌株对脐腹小蠹幼虫的致病力，结合各菌株菌落直径、孢子萌发率、产孢量和菌落生长速率 4 个培养特征，筛选到 Bb773 和 Pc546 2 株优良的菌株，在此基础上，进一步对这 2 株菌株的几丁质酶、蛋白质酶和荧光素二乙酸酯（FDA）水解酶活性进行了测定。**【结果】** 菌株 Bb773 和菌株 Pc546 在浓度为 1×10^7 孢子/mL 悬浮液处理后，10 d 的后脐腹小蠹幼虫的校正死亡率分别达 96.67%和 90.00%，致死中时分别为 3.61 d 和 4.18 d。菌株 Bb773 的几丁质酶、FDA 水解酶和蛋白质酶活性在接种后第 2～10 天均高于菌株 Pc546，2 株菌株蛋白质酶活性差异均达到了显著水平（$P<0.05$）。**【结论】** 确定了菌株 Bb773 在脐腹小蠹害虫生物防治中具有潜在的应用价值。

关键词 脐腹小蠹，致病力，培养特征，几丁质酶，蛋白质酶，FDA 水解酶，筛选

Screening of highly virulent strains of fungi entomopathogenic to *Scolytus schevyrewi* Semenov

FAN Li-Hua[1**] NIU Hui-Lin[2] ZHANG Jin-Tong[1***] LIU Jin-Long[1] YANG Mei-Hong[1] ZONG Shi-Xiang[3]

(1. Institute of Chemical Ecology of Art and Science College, Shanxi Agriculture University, Taigu 030801, China;
2. Gaoshawo Management Station of Ningxia Habahu Natural Reserve, Yanchi 751501, China;
3. Key Laboratory for Silviculture and Conservation of Ministry of Education, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract **[Objectives]** To identify highly virulent strains of fungi entomopathogenic to *Scolytus schevyrewi* Semenov, one of the boring pests of *Ulmus pumila*. **[Methods]** The pathogenicity of two superior strains, Bb773 and Pc546, to *S. schevyrewi* larvae was examined and the culture characteristics of these strains, including the final colony size, spore generation, sporulation and average growth rate, determined. A preliminary screening examined chitinase, proteinase and FDA hydrolase activities of the two selected strains. **[Results]** Adjusted death rates and median lethal time (LT_{50}) of *S. schevyrewi* larvae ten days after infection with strains Bb773 and Pc546 at a concentration of 1×10^7 conidia/mL were 96.67%, 90.00% and 3.61 d , 4.18 d, respectively. Chitinase, proteinase and FDA hydrolase activity of strain Bb773 was higher than that of strain Pc546 after about 2-10 days culture and proteinase activity was also significantly higher ($P<0.05$). **[Conclusion]** Strain Bb773 has greater potential as a biological control agent for the sustainable control of *S. schevyrewi*.

Key words *Scolytus schevyrewi*, pathogenicity, culture characteristics, chitinase, proteinase, FDA hydrolase activities, screening

---

* 资助项目：国家十二五科技支撑项目（2012BAD19B0701）；山西农业大学科技创新基金项目（201227）；山西农业大学博士科研启动项目（XB2011006）

**E-mail: fanlihua2011@163.com

***通讯作者，E-mail: zhangjintong@126.com

收稿日期：2013-10-09，接受日期：2013-12-10

脐腹小蠹 *Scolytus schevyrewi* Semenov 是白榆（*Ulmus pumila*）的主要蛀干害虫。多分布于亚洲地区，中国主要分布于华北、东北和西北地区（殷惠芬等，1984）。经调查，从 2008 年开始连续多年在宁夏盐池县白榆遭受脐腹小蠹的危害，已致大片的白榆死亡（范丽华等，2011）。脐腹小蠹以幼虫期在白榆韧皮部和木质部间的形成层取食，造成韧皮部和木质部分离，树木表现为叶片萎蔫，枝条干枯，当年或第 2 年即死亡（Negron *et al.*，2005）。由于脐腹小蠹具隐蔽性强、产生耐药性、繁殖迅速等特点，对其防治具有极大的挑战性，所以寻找一种新的无公害无污染的微生物制剂，作为生物防治技术手段显得十分必要。

虫生真菌在害虫防控方面具有极大的应用潜力。大多虫生真菌具有广泛的寄主谱，能作用于不同发育阶段的多种害虫，并自发在害虫种群间传播扩散，宿主对其不存在耐药性，资源广泛，易于工业化生产，无毒无害，使用安全方便，可对害虫实现长期的持续控制(林华峰，1998)。目前，虫生真菌作为一种新型环保的害虫防治手段被成功应用于各种农林害虫的生物防治中(Ho *et al.*，2002；范丽华等，2005；Sergio *et al.*，2005；Fernando，2006；童应华等，2010），具有广阔的开发和科研前景。

为探讨使用虫生真菌防治脐腹小蠹的有效途径，并筛选对该害虫高毒力的优良菌株，本试验测定了 3 株白僵菌、1 株绿僵菌和 1 株环链拟青霉共 5 株虫生真菌菌株对脐腹小蠹幼虫的致病力，结合各菌株的菌落培养特征和几丁质酶、蛋白酶和 FDA 水解酶 3 种酶的活性指标，最终筛选出目的菌株，为以后林间大规模防治该害虫奠定基础。

1　材料与方法

1.1　供试材料

1.1.1　试虫来源　于 5 月到 7 月初赴宁夏回族自治区吴忠市盐池县机械化林场高沙窝分场，选择被脐腹小蠹严重危害的白榆，将受害白榆锯成木段带回实验室，剥开榆皮选取 3 龄幼虫作为研究对象。

1.1.2　供试菌株　如表 1 所示。

1.1.3　培养基　SDAY 固体培养基：葡萄糖 10 g，酵母 10 g，蛋白胨 10 g，琼脂 20 g，水 1 000 mL，自然 pH；SDY 液体培养基：葡萄糖 10 g，酵母 10 g，蛋白胨 10 g，水 1 000 mL，自然 pH。

表 1　供试菌株来源
Table 1　Origin of the strains used in this study

工作号 Job number	GenBank 登录号 GenBank accession number	菌种名 Strains name	菌种来源 Source	采集号 Collection number
Bb773	RCEF1609	球孢白僵菌 *Beauveria bassiana*	皖琅琊山 Langya Mountain of Anhui	LYS050517-108
Ma1	RCEF0193	金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae*	贵州 Guizhou	Ma3305
Bb2324	RCEF4589	球孢白僵菌 *Beauveria bassiana*	皖舒城 Shucheng County of Anhui	WFS090622-90
Bb2283	RCEF4415	球孢白僵菌 *Beauveria bassiana*	山西古交 Gujiao City of ShanxI	GJ080806-01
Pc546	RCEF3815	环链拟青霉 *Paecilomyces cateni*	皖舒城 Shucheng County of Anhui	WFS070719

1.2 不同虫生真菌株对 5 龄脐腹小蠹幼虫的致病力测定

将脐腹小蠹幼虫放入铺有 3 层滤纸的圆柱形玻璃养虫盒（直径 10 cm，高 15 cm）内，滤纸经去离子浸湿，将 5 株浓度为 1×10^7 孢子/mL 的菌株的单孢子悬液装入喉头喷雾器中，对培养盒中的幼虫进行等距离喷雾，每个处理 30 头 3 龄幼虫，4 次重复，盒内放入湿棉球以保持高湿，将幼虫放在两块新鲜榆树皮中间，轻轻用橡皮筋绑住，培养盒加盖后置于培养箱中（25±1）℃，以灭菌的 0.1%吐温 80 溶液代替单孢子悬液作为空白对照，至试虫全部死亡为止，统计各菌株喷施后试虫的死亡数目，并计算校正死亡率。

校正死亡率（%）=（处理组死亡率－对照组死亡率）/（1－对照组死亡率）×100。

1.3 孢子萌发率的测定

将不同菌株的孢子粉用 0.1%吐温 80 配成 1.0×10^7 孢子/mL 的悬液，接种到 50 mL SDAY 液体培养基中。摇床上 200 r/min 26℃黑暗培养。12 h 后取菌液于载玻片上并观察，随机检查 500 个以上的孢子，计算孢子萌发率。

1.4 菌落产孢量、最终直径和生长速率的测定

SDAY 平板培养基培养各菌株至孢子完全脱落，备用。产孢量的测定：用直径为 10 mm 的打孔器在菌落中心至边缘 1/2 处取菌落块，转移至 30 mL 无菌水的小锥形瓶中，振荡后配成孢子悬液，用血球计数板在光学显微镜下测定孢子量，5 次重复。菌落直径及菌丝生长速度的测定：取 SDAY 平板上的孢子粉，根据产孢量，配成 1.0×10^7 孢子/mL 的 0.1%吐温 80 菌悬液，取 5 μL 滴于 SDAY 平板的中心，26℃培养，每个处理 5 次重复。接种 10 d 内，隔天定时用游标卡尺测定各培养基的菌落直径，并计算菌落的平均生长速率。

1.5 菌株产酶水平的测定

1.5.1 菌株几丁质酶活性的测定 将 5 株菌株溶入 SDY 液体培养基（121℃下灭菌 25 min）的三角瓶中，配成 1×10^7 孢子/mL 的浓度作为待测酶液（酶液制备方法下同），用吸量管吸取 1.0 mL 酶液到离心管中，再加 1.0 mL 1%的胶体几丁质，快速混匀，37℃水浴保温反应 4 h，4 000 r/min 离心 10 min 终止酶促反应。取 0.4 mL 上清液到干净的试管中，加入 0.2 mL 饱和硼砂溶液，摇匀，灭菌 7 min，后放入冷水并剧烈摇动冷却至室温。再加入 2.0 mL 冰乙酸和 1.0 mL 1%对二氨基苯甲醛(DMAB)溶液，摇匀，37℃水浴保温显色 20 min，立即取出放入冷水并剧烈摇动使之立即冷却至室温。测定在光波长λ为 585 nm 下的吸光度值 A。据绘制的工作曲线和回归方程来计算酶活力，一个酶活单位(U)定义为每小时分解胶体几丁质产生 1 μg N-乙酰氨葡萄糖的酶量。可按如下算式计算。

$$U= 5/4\times\Delta A\times K\times N$$

式中：ΔA 为空白校正后的吸光度值；K 为标准工作曲线上 A=1 时对应的 N-乙酰葡萄糖胺微克数；N 为酶溶液稀释倍数。

1.5.2 菌株蛋白酶活性的测定 用 0.05 mol/L pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液配制 2%的酪蛋白溶液作为底物，吸量管吸取 1.0 mL 的待测酶液到干净的试管中，加入 1.0 mL 2%的酪蛋白溶液，37℃下水浴 30 min，立即加入 2 mL 0.4 mol/L 的三氯乙酸，剧烈摇动使之终止反应。取另一支试管，加入 1.0 mL 待测酶液，立即加入 0.4 mol/L 的三氯乙酸 2 mL，用力摇匀后，再加入 1.0 mL 2%的酪蛋白溶液，作为空白对照，过滤后备用。取滤液 1.0 mL 于干净的试管中，加入 0.4 mol/L 碳酸钠溶液 5.0 mL，摇匀后，再加入 0.33 mol/L 的 Folin-酚试剂 1.0 mL，摇匀。37℃水浴加热显色 30 min，取出迅速放入冷水中并剧烈摇动使之冷却至室温，用分光光度法测定λ为 680 nm 处的吸光值 A。根据标准曲线计算酶活性，一个酶活性单位(U)为每分钟分解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸的酶量，可按如下算式计算：

$$U=(A_{样品}-A_{对照})\times K\times N\times(V/t)$$

式中：$A_{样品}$为样品液的吸光度值；$A_{对照}$为对照液的吸光度值；K 为标准工作曲线上 A=1 时对应的酪氨酸的微克数；N 为酶溶液稀释倍数；

V 为酶促反应液的体积；t 为酶促反应时间。

1.5.3　菌株荧光素二乙酸酯(FDA)水解酶活性的测定　取 500 μL 浓度为 1×10^7 孢子/mL 的待测酶液到干净的试管中，加入 5.0 mL pH 为 7.6 的磷酸缓冲溶液，快速混匀，加 4.8 mmol/L 的荧光素二乙酸酯(FDA)标准溶液 20 μL，快速混匀，37℃水浴 1 h，取出并加入 5.0 mL 丙酮，快速混匀使酶促反应终止。用分光光度计测定λ为 490 nm 处的吸光值 A，根据标准工作曲线计算荧光素的释放量，可按如下算式进行活性计算：

$$U_{FDA}=\frac{C\times V}{v\times t}$$

其中：C 为 FDA 分解所生成荧光素的质量浓度；V 为 FDA 水解酶测定体系反应液的总体积；v 为待测菌液或酶液的体积数；t 为 FDA 水解酶测定体系反应时间。

2　结果与分析

2.1　不同菌株对脐腹小蠹幼虫的致病力测定

不同菌株对脐腹小蠹幼虫致病力的试验结果如表 2 所示，可以看出，5 株供试菌株的 1×10^7 孢子/mL 单孢子悬液对脐腹小蠹 3 龄幼虫均表现出一定的致病力。菌株 Bb773 和 Pc546 对脐腹小蠹幼虫的致病力效果较菌株 Mal、Bb2324 和 Bb2283 好，除第 2 天的测定外，其余校正死亡率差异达到了显著性水平（$P<0.05$），处理后第 10 天脐腹小蠹幼虫的校正死亡率分别达 96.67%和 90.00%，毒力回归方程分别为 $Y=2.82X+3.92$ 和 $Y=2.96X+3.29$，致死中时分别为 3.61 d 和 4.18 d，其中，菌株 Bb773 处理后脐腹小蠹幼虫的校正死亡率均大于菌株 Pc546 处理。

表 2　5 株真菌菌株对脐腹小蠹幼虫的致病力（平均值±标准差）

Table 2　Pathogenicity of the tested five strains against *Scolytus schevyrewi* larvae (mean±SD)

菌株 Strains	幼虫校正死亡率（%） Larval adjusted mortality (%)				
	2 d	4 d	6 d	8 d	10 d
Bb773	18.33±0.82a	53.33±0.58a	75.00±0.58a	92.50±0.50a	96.67±0.00a
Ma1	6.67±1.29d	24.17±0.96d	50.83±0.50e	74.17±0.50de	81.67±0.58d
Bb2324	9.17±0.50c	24.17±0.50d	55.00±1.29d	71.67±0.82d	80.00±0.82d
Bb2283	15.83±0.50b	31.67±0.82c	62.50±0.96c	77.50±1.26c	88.33±0.58c
Pc546	15.83±0.50b	45.00±0.00b	67.50±0.50b	83.33±0.58b	90.00±1.41b

注：同列数据后标有不同字母表示经 Duncan’s 检验差异显著($P<0.05$)，下表同。

Data in the same column followed by different letters are significantly different at 0.05 level by Duncan’s multiple range test, the same below.

表 3　5 株菌株的毒力回归方程和致死中时

Table 3　Regression equation and LT_{50} of five strains

菌株 Strains	毒力回归方程 Regression equation	致死中时 LT_{50} (d)
Bb773	$Y=2.82X+3.92$	3.61
Ma1	$Y=2.33X+3.55$	5.65
Bb2324	$Y=2.58X+3.24$	5.59
Bb2283	$Y=2.88X+3.18$	4.65
Pc546	$Y=2.96X+3.29$	4.18

2.2 不同菌株的生长速率、产孢量和萌发率的测定

5 株菌株的最终菌落直径、孢子萌发率、产孢量及菌落生长速率结果见表 4，菌株 Bb773 和 Pc546 在 SDAY 培养基上的菌落生长速率、产孢量、孢子萌发率及最终菌落直径 4 项菌株的培养特征均优于其他 3 株菌株，其中，最终菌落直径和产孢量的差异达到了显著水平（$P<0.05$）。结合 5 株菌株对脐腹小蠹幼虫的致病力和致死中时结果，我们选取了 Bb773 和 Pc546 两株菌株进行进一步的筛选。

2.3 不同菌株产酶水平的测定

2.3.1 不同菌株几丁质酶活性的测定 菌株 Bb773 和 Pc546 的几丁质酶活性随培养时间的变化结果见图 1，试验结果表明，菌株 Bb773 和 Pc546 的几丁质酶活性最高值分别出现在培养第 4 天和第 6 天，菌株 Bb773 的几丁质酶活性总体上要高于菌株 Pc546，在培养 4 d 时差异达到了显著水平（$P<0.05$）。

2.3.2 不同菌株蛋白酶活性的测定 菌株 Bb773 和 Pc546 的蛋白酶活性随培养时间的变化试验结果见图 2，可以看出，菌株 Bb773 和 Pc546 在培养第 2 天蛋白酶活性最高，第 4、6 和 8 天逐渐减小，到培养第 10 天出现小幅增加。菌株 Bb773 的蛋白酶活性高于菌株 Pc546 的蛋白酶活性，且差异性均达到了显著水平（$P<0.05$）。

2.3.3 不同菌株荧光素二乙酸酯(FDA)水解酶活性的测定 菌株 Bb773 和 Pc546 的 FDA 水解酶活性随培养时间的变化试验结果见图 3，可以看出，菌株 Bb773 和 Pc546 在培养第 4 天 FDA 活性酶活性最高。菌株 Bb773 的 FDA 水解酶活性高于菌株 Pc546 的活性，且分别在接种后 2、4、6、10 d 时差异达到了显著水平（$P<0.05$）。

3 讨论

本研究中被筛选的 5 株虫生真菌菌株中，包括 3 株球孢白僵菌菌株、1 株环链拟青霉和 1 株绿僵菌，根据各菌株对脐腹小蠹 3 龄幼虫的致病力，结合菌落的培养特征，包括最终菌落直径、产孢量、孢子萌发率和菌落生长速率 4 个指标，先筛选到了 Bb773 和 Pc546 两株菌株，继而根据两菌株的几丁质酶、蛋白质酶和 FDA 水解酶活性再次进行筛选，最终确定，白僵菌菌株 Bb773 是 5 株虫生真菌中最优良的一株。

蔡国贵(2003)认为，从不同的温度和湿度对孢子的萌发率影响情况看，环境条件对白僵菌的致病力会有一定影响，在一定的温度范围内，菌株的侵染力随温度的升高而增强，湿度比温度更

表 4 5 株菌株的培养特征（平均值±标准差）
Table 4 Culture characteristics of five strains (mean±SD)

菌株 Strains	最终菌落直径 The final length of colony (mm)	萌发率 Spore generation rate (%)	产孢量 Sporulation ($\times10^8\cdot mL^{-1}$)	菌落生长速率 Average growth rate of colonies ($mm\cdot d^{-1}$)
Bb773	51.89±0.53a	95.64±4.42a	1.21±0.02a	5.02±0.04a
Ma1	44.91±0.55b	88.51±2.29a	0.90±0.01d	2.99±0.05b

* 资助项目：国家十二五科技支撑项目（2012BAD19B0701）；山西农业大学科技创新基金项目（201227）；山西农业大学博士科研启动项目（XB2011006）
**E-mail: fanlihua2011@163.com
***通讯作者，E-mail: zhangjintong@126.com
收稿日期：2013-10-09，接受日期：2013-12-10

Bb2324	43.22±0. 32b	83.77±2.43b	0.66±0.04e	2.48±0.07c
Bb2283	42.83±0.30b	90.08±2.72a	0.95±0.03c	2.13±0.06d
Pc546	50.89±0.21a	92.03±2.65a	1.04±0.02b	3.15±0.04b

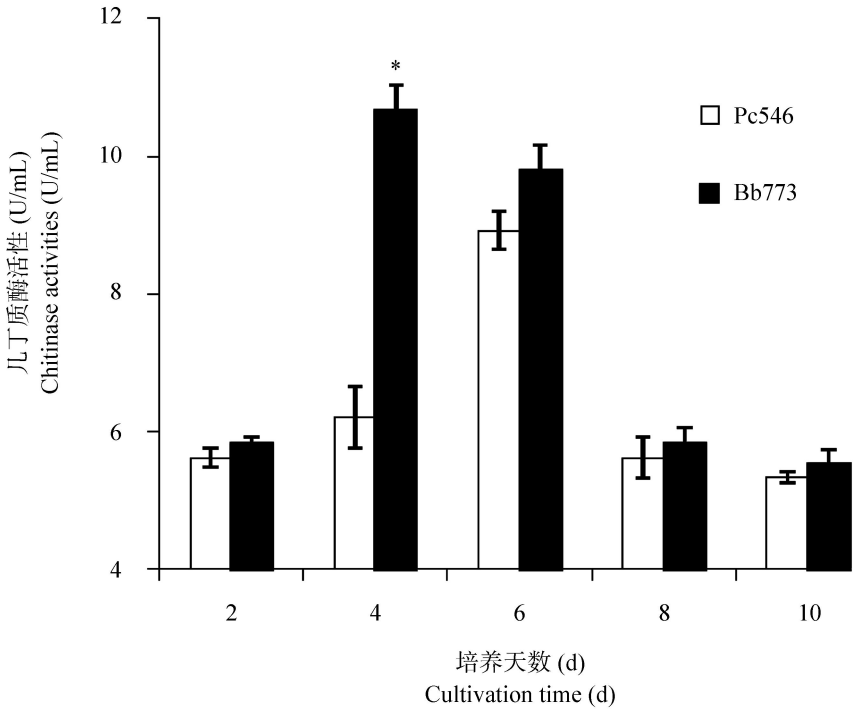

图 1　菌株 Bb773 和 Pc546 的几丁质酶活性随培养时间的变化

Fig. 1　Chitinase activities trend of strains Bb773 and Pc546 with cultivation time

*代表两种真菌的酶活性经 Duncan's 检验有显著性差异（$P<0.05$）。下图同。

* means that activities of enzymes of two strains of fungi have significant difference at 0.05 level by Duncan's multiple range test.The same below.

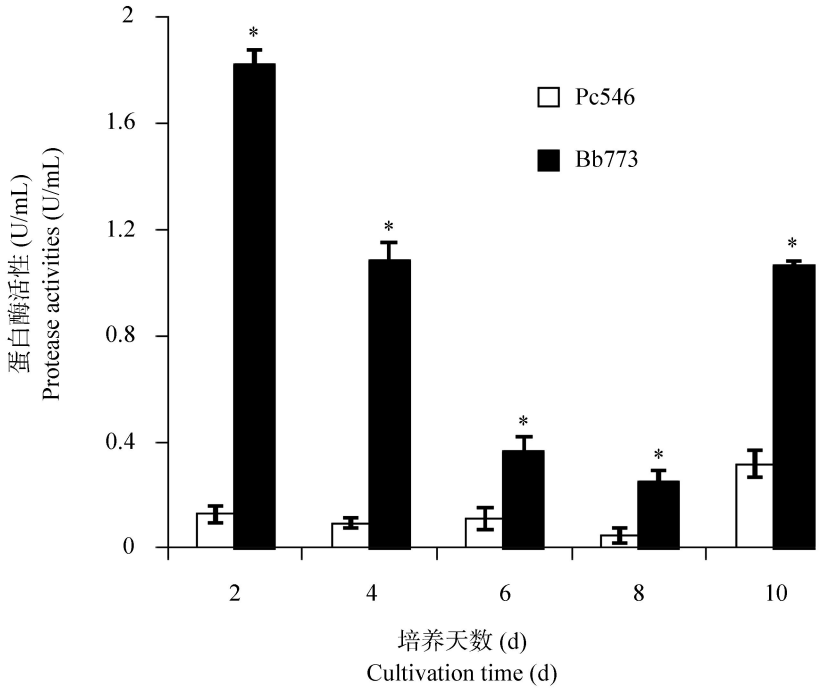

图2　菌株Bb773和Pc546的蛋白酶活性随培养时间的变化

Fig. 2　Proteinase activities trend of strains Bb773 and Pc546 with cultivation time

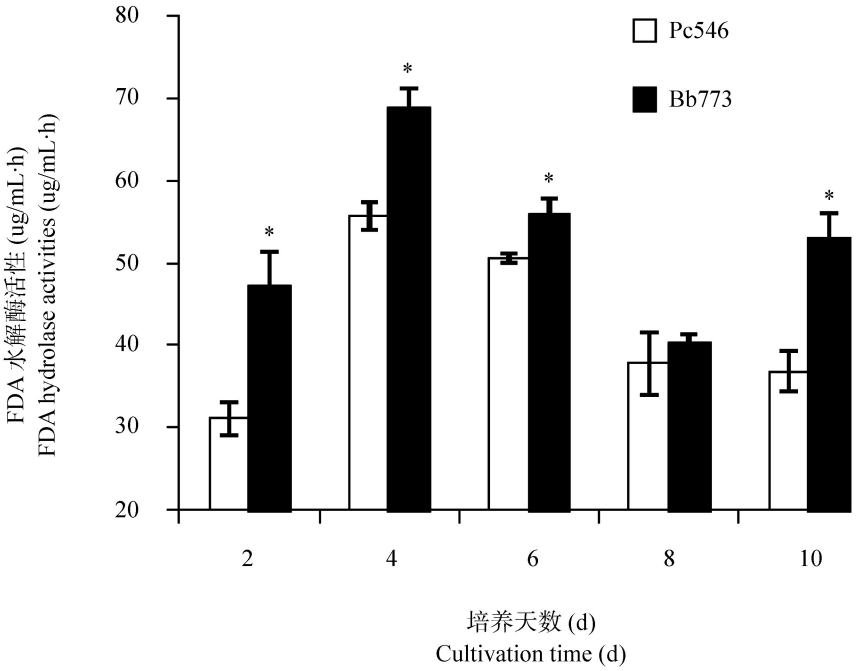

图 3　菌株 Bb773 和 Pc546 的 FDA 水解酶活性随培养时间的变化

Fig. 3　FDA hydrolase activities trend of strains Bb773 and Pc546 with cultivation time

为重要，在应用菌剂防治目标害虫时必须掌握有利的气候条件，并采取适当的施菌方式，以提高白僵菌的杀虫效果。本研究是在 5—7 月间实施，温度条件可以达到，另外，脐腹小蠹幼虫取食时

具有群集性，在白榆木质部到韧皮部之间的形成层取食，采用针刺法，既可将白僵菌直接送达脐腹小蠹幼虫群集处，又可增加湿度，完全可以在田间实施白僵菌对脐腹小蠹幼虫的防治。所以，白僵菌 Bb773 在脐腹小蠹的田间防治中具有很好的应用潜力。

菌落生长速率、产孢量等菌株培养特征均与菌株的毒力有关(Moor *et al.*，1997；Wang *et al.*，2005；刘玉军等，2008)。本研究中，培养特征较优良的菌株其毒力也较强，LT_{50} 最小。今后筛选高毒力虫生真菌菌株时可依据菌丝生长速度快、孢子萌发率高、产孢量大及菌落直径大等特点进行初步筛选，以减轻繁重的生物测定任务。

虫生真菌的入侵是机械压力和酶共同作用的结果（王记祥和马良进, 2009）。虫生真菌侵入过程中发现的主要酶类有蛋白质酶、几丁质酶、酯酶、脂酶和淀粉酶等（Robert and Messing，1985），已有很多研究表明，菌株胞外蛋白酶水平和菌株的毒力大小有很大关系（Stleger *et al.*，1988； 樊美珍等，1994）。Elsayed 等(1989)则证明了几丁质酶的活性与真菌的毒力存在相关性。本研究结论与以上结论完全一致。

通过测定 FAD 水解酶活性来表征菌株生物活性高低已有先例（王佳佳等，2012），将其作为一种简便有效的虫生真菌菌株筛选手段有着重要意义。选取 FAD 水解酶活性作为一种菌株筛选手段不仅可以省去繁琐复杂的测试试剂的配置，极大地简化了菌株筛选过程。本实验中，FDA 水解酶活性高，菌株毒力强，所以有必要将测定 FDA 水解酶活性作为一种新的快捷的虫生真菌菌株筛选手段做更进一步的深入研究。

今后，需要进一步研究不同浓度的白僵菌菌株 Bb773 对不同龄期脐腹小蠹幼虫的致病力，找到最佳的施药浓度和易致病合适龄期的幼虫，并通过田间推广应用示范，争取尽快将该菌株应用于脐腹小蠹的绿色防控。

参考文献 (References)

Elsayed GN, Goudron TA, lgnoff CM, 1989. Chtinolytic activity and virulence associated with native and mutant isolates of an entomopathogenic fungus Nomuraca．*J. Invertebr. Pathof*, 54: 394–403.

Fernando EV, 2006. Inoculation and colonization of coffee seedling (*Coffea arabica* L.) with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiaria* (Ascomycota: Hipocreales). *Mycoscience*, 47(5): 284–289.

Ho YC, harry KK, Jin H, Dong WL, Sang ML, 2002. Entomopathogenic nematodes (*Steinernma* spp. and *Heterorhabsitis bacteriophora*) and a fungus *Beauveria brongniartii* for biological control of the white grubs *Ectinohoplia rufipes* and *Exomala orientalis*, in Korean golf courses. *Bio. Control.*, 47: 177–192.

Moor D, Langewald J, Obognon F, 1997．Effects of rehydration on the conidial viability of *Metarhizium flavoviride* mycopesticide formulations．*Biocontrol Sci. Technol.*, 7(1): 87–94.

Negron JF, Witcosky JJ, Cain RJ, LaBonte JR, Duerr II DA, McElwey SJ, Lee JC, Seybold SJ, 2005. The banded elm bark beetle: A new threat to elms in North America. *Amer. Entomol.*, 2: 84–93.

Robert A, Messing AL, 1985. Acid production by metarhiziumm anisoplia: efects on virulence against mosquitoes and on detection of in vitro amylase, protease and lipase activity. *Invertebr. Pathol.*, 45: 9–l5.

Sergio BA, Marco AT, Luciana SR, Enrique C, 2005．*Beauveria bassiana* pathogenicity to the citrus rust mite *Phyllocoptruta oleivora*. *Exp. Appl. Acarol.*, 37: 117–122.

Stleger RJ, Durrands PK, Charnley AK, 1988. The role of extracellular chymoelastase in virulence of *Metarhizium anisopliase* for *Manduca sexta*. *J. Invertebr. Patho1.*, 52: 285–293.

Wang CS, Tariq MB, Raymond JSL, 2005. Colony sectorization of *Metarhizium anisopliae* is a sign of ageing. *Microbiology*, 151(10): 3223–3236.

蔡国贵, 2003. 刚竹毒蛾白僵菌优良菌株筛选及生产应用研究. 林业科学, 39(2): 102–108. [Cai GG, 2003. Screening of the superior strains of beauveria bassiana of pantan a phyllostachysae and practical application. *Scientia Silvae Sinicae*, 39(2): 102-108.]

樊美珍, 胡锦江, 李农吕, 李莉, 李华, 1994. 球孢白僵菌胞外蛋白酶及其与毒力关系的研究. 微生物学通报, 21(4): 202–206．[Fan MZ, Hu JJ, Li NL, Li L, Li H, 1994. Studies on the extracellaluar protease and its virulence relationship. *Microbiology Bulletin*, 21(4): 202–206.]

范丽华, 谢映平, 原贵生, 牛宇, 2005. 应用白僵菌防治靖远松叶蜂的研究. 中国森林病虫, 24(4): 29–32. [Fan LH, Xie YP,

Yuan GS, Niu Y, 2005. Application of the muscardine, beauveria bassiana against, diprion jingyuanensis. *Forest Pest and Disease*, 24(4): 29-32.]

范丽华, 张金桐, 李月华, 骆有庆, 宗世祥, 杨美红, 2011. 脐腹小蠹的形态特征和生物学特性观察. 应用昆虫学报, 48(3): 657–663. [Fan LH, Zhang JT, Li YH, Luo YQ, Zong SX, Yang MH, 2011. morhpological traits and bionomics of scolytus schevyrewi seme. (Coleoptera: Scolytidae). *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(3): 657-663.]

林华峰, 1998. 虫生真菌研究进展. 安徽农业大学学报, 25(3): 251–254.[Lin HF, 1998. Progress of the research on the fungus of insects. *Journal of Anhui Agriculture University*, 25(3): 251–254.]

刘玉军, 张龙娃, 何亚琼, 王滨, 丁德贵, 李增智, 2008. 栎旋木柄天牛高毒力球孢白僵菌菌株的筛选. 昆虫学报, 51(2): 143–149. [Liu YJ, Zhang LW, He YQ, Wang B, Ding DG, Li ZZ, 2008. Screening of high virulent strains of beauveria bassiana against a dangerous forest cerambycid beetle, aphrodisium sauteri (Coleoptera: Cerambycidae). *Acta Entomologica Sinica*, 51(2): 143-149.]

童应华, 陈顺立, 林强, 2010. 感染萧氏松茎象的金龟子绿僵菌菌株的初步筛选. 林业科学, 46(1): 169–174. [Tong YH, Chen SL, Lin Q, 2010. Preliminary screen of virulent strains of metarhizium anisopliae against hylobitelus xiaoi. *Scientia Silvae Sinicae*, 46(1): 169-174.]

王记祥, 马良进, 2009. 虫生真菌在农林害虫生物防治中的应用. 浙江林业学报, 26(2): 286 – 291. [Wang JX, Ma LJ, 2009. Application of entomogenous fungi in biological control of agric ulture and forestry pests. *Journal of Zhejiang Forestry College*, 26(2): 286-291.]

王佳佳, 周桦, 张进, 范世华, 2012. 土壤样品中微生物活性的荧光分析方法. 环境化学, 31(10): 1637–1644. [Wang JJ, Zhou H, Zhang J, Fan SH, 2012. Fluorescence determination of microbial activity in soil sample. *Environmental Chemistry*, 31(10): 1637-1644.]

殷惠芬, 黄复生, 李兆麟, 1984. 中国经济昆虫志. 第二十九册 (鞘翅目小蠹科). 北京: 科学出版社. 18–22.[Yin HF, Huang FS, Li ZL, 1984. Economic insect fauna of Chinese. Twenty-ninth volumes (*Coleoptera: Scolytidae*).Beijing: *Science Press*. 18-22.]