虫生真菌 LL-01 鉴定及对两种检疫性粉蚧的致病性*

黄 鹏[1**] 姚锦爱[1] 蓝炎阳[2] 余德亿[1***] 侯翔宇[1]

（1. 福建省作物有害生物监测与治理重点实验室，福建省农业科学院植物保护研究所，
福建省作物有害生物绿色防控工程研究中心，福州 350013；2. 漳州农业科技园区研发中心，漳州 363204）

摘 要 【**目的**】为丰富南洋臀纹粉蚧 *Planococcus lilacinus* 和石蒜绵粉蚧 *Phenacoccus solani* 的生防菌资源。【**方法**】本研究从感病南洋臀纹粉蚧上分离生防菌，采用基因序列分析方法进行种类鉴定，并在室内优化其培养条件，评估其对这 2 种检疫性粉蚧的致病性。【**结果**】分离得到 1 株编号为 LL-01 的虫生真菌，经 rDNA-ITS、18S rDNA 和 Nad1 序列分析确定为蜡蚧轮枝菌；该菌的生长和产孢最适的温度为 26 ℃，光周期为 6L∶18D，碳源为果糖，氮源为干酪素，此条件下培养 10 d 的蜡蚧轮枝菌菌落直径和产孢量分别可达 4.66 cm 和 3.16×10^8 孢子/cm^2；其侵染不同虫龄南洋臀纹粉蚧和石蒜绵粉蚧 10 d 后的 LC_{50} 分别为 9.80×10^4-9.17×10^5 孢子/mL 和 5.00×10^4-5.30×10^5 孢子/mL。浓度为 1.00×10^8 孢子/mL 的蜡蚧轮枝菌侵染南洋臀纹粉蚧和石蒜绵粉蚧后第 10 天，其累计致死率分别为 84.09%-97.62%和 89.89%-98.85%，LT_{50} 分别为 3.70-5.84 d 和 3.48-5.14 d；在侵染第 5 天时，蛋白酶和几丁质酶活性分别达峰值 19.44 U/mL 和 15.01 U/mL，脂肪酶活性在侵染第 6 天时达到峰值 7.68 U/mL。【**结论**】蜡蚧轮枝菌 LL-01 生长速度快、产孢量高，对这 2 种检疫性粉蚧的致病性强。

关键词 蜡蚧轮枝菌；南洋臀纹粉蚧；石蒜绵粉蚧；致病性

Identification of the entomopathogenic fungus LL-01 and assessing its pathogenicity to two mealybugs

HUANG Peng[1**] YAO Jin-Ai[1] LAN Yan-Yang[2] YU De-Yi[1***] HOU Xiang-Yu[1]

(1. Fujian Key Laboratory for Monitoring and Integrated Management of Crop Pests, Institute of Plant Protection, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fujian Engineering Research Center for Green Pest Management, Fuzhou 350013, China; 2. Research and Development Centre of Zhangzhou National Agricultural Science and Technology Zone, Zhangzhou 363204, China)

Abstract **[Objectives]** To increase the number of fungal biocontrol agents available for controlling the mealybugs *Planococcus lilacinus* and *Phenacoccus solani*. **[Methods]** Fungi were isolated from fungus-infected mealybugs and their taxonomic statis, culture conditions and pathogenicity to *P. lilacinus* and *P. solani* were determined. **[Results]** A strain of the entomopathogenic fungus LL-01 isolated from infected *P. lilacinus* was identified as *Lecanicillium lecanii* on the basis of rDNA-ITS, 18S rDNA and Nad1 gene sequence analysis. The optimal culture conditions for the growth and sporulation of this strain were 26 ℃, 6L∶18D, with fructose as a carbon source and casein as a nitrogen source. Under these conditions, the colony diameter and sporulation of the LL-01 strain after ten days cultivation were 4.66 cm and 4.16×10^8 conidia/cm^2, respectively. The LC_{50} values of this strain after 10 days for different instars of *P. lilacinus* and *P. solani* were 9.80×10^4-9.17×10^5 conidia/mL and 5.00×10^4-5.30×10^5 conidia/mL, respectively. Mortality was 84.09%-97.62% and 89.89%-98.85%, respectively and the LT_{50} values for a dose of 1×10^8 conidia/mL were 3.70-5.84 d and 3.48-5.14 d, respectively. The peaks of

*资助项目 Supported projects：福建省省属公益类科研院所基本科研专项（2020R1024004）；福建省农业科学院项目（CXTD2021005-2）；福建省农业高质量发展超越“5511”协同创新工程项目（XTCXGC2021011 和 XTCXGC2021017）

**第一作者 First author，E-mail：375202928@qq.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：yudy_2004@126.com

收稿日期 Received：2021-04-30；接受日期 Accepted：2022-04-11

protease and chitinase activity of the fungal strain were 19.44 U/mL and 15.01 U/mL, respectively, on the fifth day post-infection, and the peak lipase value was 7.68 U/mL recorded on the sixth day post-infection. **[Conclusion]** The fungul strain *L. lecanii* LL-01 has fast growth and high sporulation, and is strongly pathogenic to *P. lilacinus* and *P. solani*.

Key words *Lecanicillium lecanii*; *Planococcus lilacinus*; *Phenacoccus solani*; pathogenicity

南洋臀纹粉蚧 *Planococcus lilacinus* 和石蒜绵粉蚧 *Phenacoccus solani* 是 2 种世界性花果害虫，2007 年被我国列入进境植物检疫性有害生物（中国人民共和国农业部，2007）；2014 年被国家质量监督检验检疫总局列为进口多肉植物重点关注的有害生物（郑斯竹等，2015）。南洋臀纹粉蚧可危害可可、番荔枝、番石榴、羊蹄甲、变叶木和杜鹃等 35 个科 100 余种水果、林木和观赏植物（Ben-Dov，1994；黄邦侃，1999）；石蒜绵粉蚧可为害石蒜科、景天科、菊科、豆科和茄科等 40 科 101 属 131 种观赏植物和经济作物（Ben-Dov，2005；潘颖佳等，2020）。虽然这 2 种检疫性粉蚧目前在国内尚未有广泛分布的报道，但本研究前期调查发现它们分别已在福建省内的番荔枝果园和多肉植物种植基地发生为害严重，世代重叠明显，若虫和成虫常群集刺吸为害果实、叶片、幼芽和嫩茎等部分，引起落花、落叶、落果和长势衰弱，同时还分泌蜜露诱发煤烟病，直接或间接影响番荔枝果实和多肉植物的品质和经济价值。由于 2 种粉蚧体表覆盖大量蜡质，不易防治，目前生产上采用的防控措施还偏重于使用化学农药，但长期使用化学农药，易造成“3R”、环境污染和生物多样性下降等负面问题，与我国绿色植保的引领导向冲突不断，需寻找更加环保的措施协同控害。

虫生真菌是自然界中昆虫种群数量得以控制的主要因素之一，其感染致死比例占昆虫自然罹病死亡总数约 60%，挖掘利用虫生真菌已是害虫绿色防控的重要措施（宋晓兵等，2017）。目前，全世界已记载的虫生真菌约 1 000 多种（Lomer *et al.*，2001），但仅金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 中的 F061 和 FM-03 等被挖掘用于防控南洋臀纹粉蚧和石蒜绵粉蚧（黄鹏等，2019；Huang *et al.*，2021），可供选择的菌株资源仍相对较少，因此有必要寻找一些高效的虫生真菌菌株以减轻这它们的危害。针对这一需求，笔者在日常调查南洋臀纹粉蚧和石蒜绵粉蚧发生为害情况期间，时刻留意虫生真菌资源的收集，在福建省漳州市诏安县金星乡番荔枝果园的果实上发现受到虫生真菌感染死亡的南洋臀纹粉蚧，鉴于昆虫病原具有杀虫范围广谱及扩散能力较强的特点（Wang *et al.*，2017；谢婷等，2020），期盼该虫生真菌也能用于防控这 2 种检疫性粉蚧。为此，本研究先分离纯化该虫生真菌，再通过形态观察和基因序列分析方法鉴定其分类地位，最后测定其对南洋臀纹粉蚧和石蒜绵粉蚧的胞外酶活性和致病力，探讨该菌的生物防治潜力和及其应用前景，为利用虫生真菌防控检疫性粉蚧提供支撑。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试菌株采自福建省漳州市诏安县金星乡番荔枝果园内（北纬 23°76′22″、东经 117°26′42″）罹病南洋臀纹粉蚧，参考的方法采用察氏培养基平板进行分离、纯化，编号为 LL-01 备用（Lu *et al.*，2015）。供试南洋臀纹粉蚧和石蒜绵粉蚧分别采自福建省诏安县金星乡的番荔枝果园和龙海市九湖镇的多肉种植基地，在室温 25-28 ℃、相对湿度 50%-60%、光周期 12L∶12D 条件下分别用番荔枝果实和多肉植物“红心莲”饲养，取次代孵化或蜕皮 1 d 的 1、2 和 3 龄若虫及雌成虫备用。

1.2 虫生真菌鉴定

1.2.1 形态观察 挑取菌株 LL-01 单孢接种于察氏培养基平板中央，置于温度（25 ± 1）℃、相对湿度 90% ± 5%、光周期 12L∶12D 的 GZX-250BSH-Ⅲ型光照培养箱内培养 10 d 后，先用 DSLR-A450 型数码单反相机观察、拍摄菌落形态特征，并测定菌落直径；再置于 E200MV 型

生物显微镜观察、拍摄菌丝、分生孢子梗、产孢细胞和分生孢子的形态特征，后参考蒲蛰龙和李增智（1996）初步鉴定虫生真菌的分类地位。

1.2.2　分子鉴定　参考 Kouvelis 等（2004）及 Lu 等（2015）的方法，取纯化后的虫生真菌菌株培养 10 d，用无菌手术刀在培养基上刮取约 0.2 g 的菌丝和孢子，加液氮研磨后使用真菌基因组 DNA 提取试剂盒提取所分离菌株的总 DNA；以总 DNA 为模板，分别采用 rDNA-ITS 基因通用引物（ITS1：5′-TCCGTAG GTGAAC-CTGCGG-3′ 和 ITS4：5′-TCCTCCGCTTATT-GATATGC-3′）、18S rDNA 基因通用引物（NS1：5′-GTAGTCATATGCTTCTCTC-3′和 NS2：5′-NS2 GGCTGCTGGCACCACACTTGC-3′）和 Nad1 基因通用引物（nad1A：5′- ATGGCSAGTATGCA-AAGAAGA-3′和 nad1B：5′-GCATGTTCTGTC-ATAAASCCACTAAC-3′）进行 PCR 扩增（PCR 反应程序：94 ℃预变性 3 min；94 ℃变性 40 s、54 ℃退火 40 s、72 ℃延伸 90 s，30 个循环；最后 72 ℃延伸 10 min）；扩增产物用含有 GelRed 染料的 1.5%琼脂糖凝胶进行电泳验证，再用 Gel Extraction Kit 凝胶回收试剂盒纯化回收，然后送生工生物工程（上海）股份有限公司测定序列。将测序所得的 3 段基因序列提交到 NCBI/GenBank 进行 BLAST 比对，把相关种属序列依次导入 DNAMAN 6、phylosuite 1 和 MEGA 7 软件，分别进行多基因序列的对齐、串联和建树，根据序列间同源性的高低最终判定所分离菌株的种类。

1.3　虫生真菌培养条件优化

1.3.1　温度选择　参考黄鹏等（2018）的方法挑取菌株 LL-01 的单孢接种于察氏培养基平板中央，然后分别置于 22、26 和 30 ℃的培养箱中黑暗培养，每个处理 3 次重复；培养 10 d 后，用十字交叉法测定菌落直径；再往每个处理培养皿中加入 10 mL 含 0.05%吐温 - 80 的无菌水，用灭菌玻片刮下分生孢子配制成孢悬液，经 3 层纱布过滤后，用纽鲍尔血球计数板在 E200 型生物显微镜下观察、测定每个处理的产孢量。

1.3.2　光照选择　挑取菌株 LL-01 的单孢接种于察氏培养基平板中央，然后分别置于 6L∶18D、12L∶12D 和 18L∶6D 光周期及温度（26±1）℃光照培养箱中培养，每个处理 3 次重复；培养 10 d 后测定菌落直径和产孢量。

1.3.3　碳源选择　参考姜灵（2018）的方法，在察氏培养基的基础上，分别以蔗糖、果糖和淀粉作为供试碳源，制成 3 种试验培养基，每个处理 3 次重复；挑取菌株 LL-01 的单孢接种于察氏培养基平板中央，再置于温度（26±1）℃、光周期 6L∶18D 的光照培养箱中培养 10 d 后，测定菌落直径和产孢量。

1.3.4　氮源选择　在察氏培养基和碳源选择的基础上，分别以硝酸钠、酵母膏和牛肉膏作为供试氮源，制成 3 种试验培养基，每个处理 3 次重复；挑取菌株 LL-01 的单孢接种于察氏培养基平板中央，再置于温度（26±1）℃、光周期 6L∶18D 的光照培养箱中培养 10 d 后，测定菌落直径和产孢量。

1.4　虫生真菌致病性评估

1.4.1　致病力测定　在培养条件优化的基础上，取培养 10 d 的菌株 LL-01，先往培养皿中加入 10 mL 含 0.05%吐温 - 80 的无菌水，再用灭菌玻片刮下分生孢子，后经 3 层纱布过滤得孢子原液，充分混匀后，计算孢子浓度；用无菌水将孢子原液稀释成 1×10^8、1×10^7、1×10^6、1×10^5 和 1×10^4 孢子/mL 5 个处理浓度，以 0.05%吐温 - 80 无菌水为对照，每个处理 3 次重复。针对南洋臀纹粉蚧，取直径 12 cm、高 10 cm 的塑料保鲜盒，每个保鲜盒中放 1 个生长 90 d 的番荔枝果实；在每个保鲜盒的盖子上挖取直径 6 cm 的透气孔，并用胶水将 1 块直径 8 cm 的防虫网（80 目）粘在透气孔上方；用毛笔分别挑取健康的南洋臀纹粉蚧各龄虫源各 30 头，在各浓度处理菌液中浸泡 10 s 后挑到滤纸上，晾干 2 min，再分别挑到番荔枝果实上，盖上保鲜盖。针对石蒜绵粉蚧，取直径 9 cm 的培养皿，依次铺入相同直径的花泥和滤纸各 1 片，花泥厚 0.5 cm 吸水 6 mL，滤纸上再放 1 片多肉植物“红心莲”的叶片，叶柄用湿棉花包裹并紧贴滤纸；接着用软毛笔分别挑取石蒜绵粉蚧各龄虫源 30 头，在各浓度处理菌

液中浸泡 10 s 后挑到滤纸上，晾干 2 min，再分别挑到叶片上，盖上培养皿。将保鲜盒和培养皿置于温度（26±1）℃、相对湿度 90%±5%、光周期 6L：18D 的 MGC-350HP-2 型人工气候箱内，每天定时观察并挑除死亡虫体，以虫体长出菌丝确认为有效侵染，观察至所有处理中试虫的死亡数停止发生变化为止。统计 2 种检疫性粉蚧的死亡率，计算菌株 LL-01 致死中浓度 LC_{50} 和不同浓度孢悬液下的致死中时间 LT_{50}。

1.4.2 胞外酶活性测定 参考 Lu 等（2015）的方法制作蛋白酶、几丁质酶和脂肪酶 3 种胞外酶液，测定其活性。胞外酶液制作：取 1×10^8 孢子/mL 的菌株 LL-01 孢子液 1 mL 分别加入到含 99 mL 蛋白酶诱导培养基（明胶 10 g，K_2HPO_4、NaCl 和 $MgSO_4\cdot7H_2O$ 各 0.3 g，溶于 1 L 浓度为 0.02 mol/L、pH=7 的磷酸盐缓冲液中）、几丁质酶诱导培养基（蛋白胨 5 g，K_2HPO_4、KCl 和 $MgSO_4\cdot7H_2O$ 各 0.5 g，$ZnSO_4\cdot7H_2O$ 1 g，胶状几丁质 10 g，溶于 1 L 蒸馏水中）或脂肪酶诱导培养基（葡萄糖 2 g，蛋白胨 5 g，$MgSO_4\cdot7H_2O$ 0.1 g，K_2HPO_4 1 g，橄榄油 20 mL，溶于 980 mL 蒸馏水中）的三角瓶中，置于 25 ℃、180 r/min 的 QYC-2102C 型全温培养摇床上培养 1-10 d；每天分别取 2 mL 的 3 种培养液用 12 000 r/min 的 KDC-140HR 型高速冷冻离心机离心 30 min，取上清液用于测定酶活性；每处理 3 个三角瓶，即重复 3 次。蛋白酶活性测定：以酪蛋白为底物；以失活蛋白酶溶液作为空白对照，利用 UV-1800PC 型紫外可见分光光度计测定各组反应混合液在 680 nm 处的吸光度值；根据 L-酪氨酸标准曲线，计算各组反应混合液的蛋白酶活性，以每分钟催化分解酪蛋白生成 1 μmol 酪氨酸的酶量为 1 个酶活单位。几丁质酶活性测定：以胶状几丁质为底物；以失活的几丁质酶溶液作为空白对照，测定各组反应混合液在 585 nm 处的吸光度值，以每分钟催化分解几丁质生成 1 μmol N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为 1 个酶活单位；根据 N-乙酰氨基葡萄糖标准曲线，计算各组反应混合液的几丁质酶活性。脂肪酶活性：以对硝基苯棕榈酸酯为底物；失活的脂肪酶溶液作为空白对照，测定各组反应混合液在 410 nm 处的吸光度值；根据对硝基苯酚标准曲线，计算各组反应混合液的脂肪酶活性，以每分钟催化分解脂肪成 1 μmol 对硝基苯酚的酶量为 1 个酶活单位。

1.5 数据分析

在 MEGA 7 软件中，利用 Neighbor-Joining 法构建菌株 LL-01 的系统发育树。在 DPS 7 软件中，利用 Tukey 检验法分别对菌株 LL-01 在不同温度、光照、碳源和氮源下的菌落直径和产孢量进行多重比较；利用机率值分析法计算菌株 LL-01 对 2 种南洋臀纹粉蚧和石蒜绵粉蚧的致死中浓度 LC_{50} 和致死中时间 LT_{50}，后取实际累计死亡率达 50%以上处理的计算数值作为有效结果。

2 结果与分析

2.1 虫生真菌分类地位

2.1.1 形态特征 菌株 LL-01 在察氏培养基平板上生长良好；菌落近圆形，初期白色，呈放射状向外扩大生长，10 d 后直径可达 3.82-4.24 cm，并在中间区域略显淡粉色（图 1：A）。菌丝细长，具分枝和分隔，宽 1.99-2.37 μm；分生孢子梗单生或聚集排列于菌丝上，宽 1.57-1.78 μm，顶端具瓶梗状产孢细胞（图 1：B）；产孢细胞单生、簇生或轮生，大小为（8.33-10.70）μm×（1.81-2.22）μm；分生孢子单生或串生于产孢细胞顶端，椭圆形或长椭圆形，大小为（2.32-5.41）μm×（1.53-1.80）μm（图 1：C）。据此，初步确定该菌株 LL-01 为轮枝菌属 *Lecanicillium*。

2.1.2 基因序列 对菌株 LL-01 的总 DNA 进行 ITS、18S 和 Nad1 扩增，分别获得长度为 560、979 和 528 bp 的序列片段，提交到 NCBI/GenBank，获取的登录号分别为 MW774268、MW774264 和 MW774934。将所得序列与 NCBI/BLAST 中的相关种属进行同源性比对，发现 3 段基因序列分别与登录号为 EU284718、AF049155 和 EF512938 的蜡蚧轮枝菌 *Lecanicillium lecanii* 序列的相似性均达 99.82%、100.00%和 99.80%，并在系统进化树上聚为一簇（图 2）。结合形态特征，最终确定该菌株为蜡蚧轮枝菌。

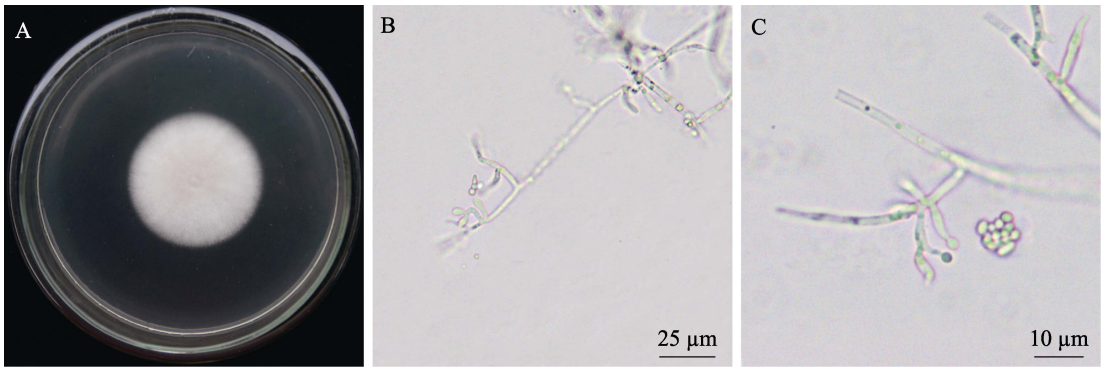

图 1　菌株 LL-01 的菌落特征（A）和显微特征（B，C）

Fig. 1　Colony morphology (A) and microscopic morphology (B, C) of strain LL-01

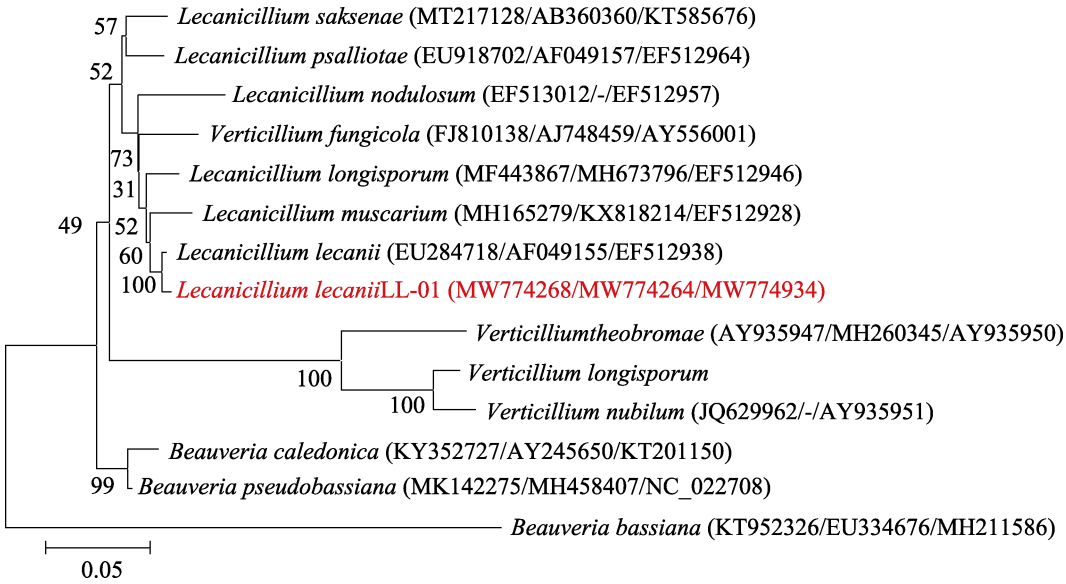

图 2　基于 rDNA-ITS、18S rDNA 和 Nad1 序列串联构建的菌株 LL-01 系统进化树

Fig. 2　Phylogenetic tree of strain LL-01 constructed based on concatenated sequences of rDNA-ITS, 18S rDNA and Nad1

括号中的登录号从左到右对应的基因顺序依次为 rDNA-ITS、18S rDNA 和 Nad1。-表示无。

Accession numbers from left to right correspond to sequences of rDNA-ITS, 18S rDNA and Nad1, respectively. - means null.

2.2　虫生真菌培养条件

2.2.1　温度　菌株 LL-01 生长和产孢受温度影响较大。菌落直径以 26 ℃和 30 ℃的最大，培养 10 d 后分别达 4.06 cm 和 3.93 cm，两者差异不显著($P>0.05$),但均显著大于 22 ℃($P<0.05$)；产孢量以 26 ℃的最高，达 1.95×10^8 孢子/cm^2，显著高于其他 2 个处理（$P<0.05$）（图 3：A）。

2.2.2　光照　菌株 LL-01 生长和产孢受光照的影响明显不同。菌落直径以光周期为 18L：6D 的最大，培养 10 d 后达 4.22 cm，虽与光周期为 12L：12D 的差异不显著（$P>0.05$），但显著大于光周期为 6L：18D（$P<0.05$）；产孢量以光周期为 6L：18D 的最高，达 2.19×10^8 孢子/cm^2，且显著高于其他 2 个处理（$P<0.05$）（图 3：B）。

2.2.3　碳源　菌株 LL-01 在不同碳源下的生长和产孢差异较大。菌落直径以果糖的最大，培养 10 d 后达 4.58 cm，显著大于其他 2 个处理（$P<0.05$）；产孢量以果糖和蔗糖的最高，分别达 2.38×10^8 孢子/cm^2 和 2.24×10^8 孢子/cm^2，两者差异不显著($P>0.05$),但显著大于淀粉($P<0.05$)（图 3：C）。

2.2.4　氮源　菌株 LL-01 在不同氮源下的生长

和产孢明显不同。菌落直径以干酪素和甘氨酸的最大，培养 10 d 后分别达 4.66 cm 和 4.63 cm，两者差异不显著（P>0.05），但均显著大于硝酸钠（P<0.05）；产孢量以干酪素的最高，达 3.16×10^8 孢子/cm^2，显著高于其他 2 个处理（P<0.05）（图 3：D）。

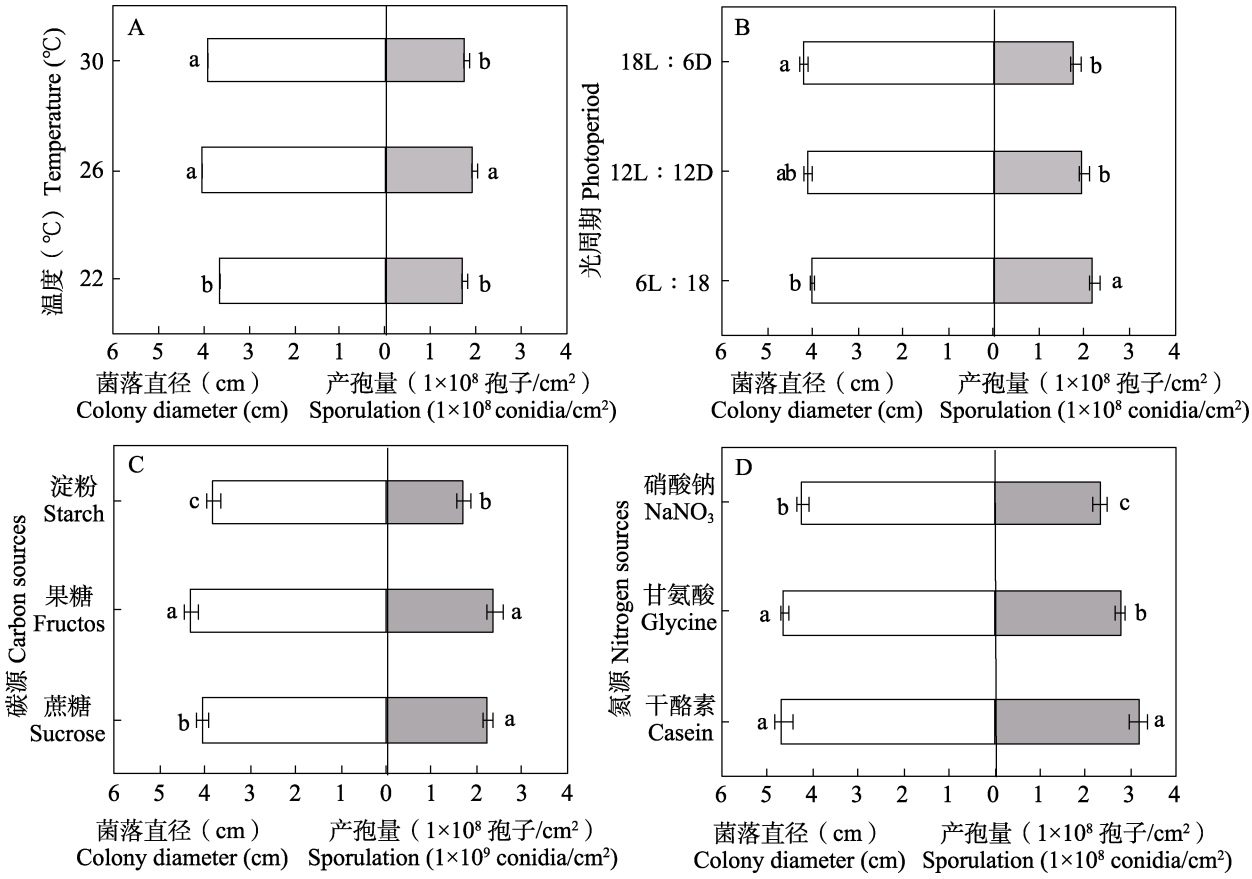

图 3 菌株 LL-01 在不同温度（A）、光照（B）、碳源（C）和氮源（D）下培养 10 d 后的菌落直径和产孢量

Fig. 3 Colony diameter and sporulation of strain LL-01 in different temperatures (A), photoperiods (B), carbon sources (C) and nitrogen sources (D) after ten days cultivation

同侧柱上标有不同小写字母表示不同处理间差异显著（P<0.05）。

Histograms with different lowercase letters in the same column indicate significantly different (P<0.05).

2.3 虫生真菌致病活性

2.3.1 致病力 菌株 LL-01 能有效侵染南洋臀纹粉蚧和石蒜绵粉蚧（图 2：A，B），接菌 10 d 后对 2 种粉蚧 1-3 龄若虫和雌成虫的 LC_{50} 分别为 9.80×10^4-9.17×10^5 孢子/mL 和 5.00×10^4-5.30×10^5 孢子/mL（表 1）；这 2 种粉蚧各虫态在浓度为 1×10^4 孢子/mL 和 1×10^5 孢子/mL 处理的死亡率均未达 50%，机率值分析法计算出的 LT_{50} 均相对偏大，超出试虫停止死亡的时间；其他 3 个处理的死亡率均有明显提高，LT_{50} 均随菌液浓度的升高而缩短，特别是 1×10^8 孢子/mL 处理浓度的死亡率分别为 84.09%-97.62%和 89.89%-98.85%（图 4：C），LT_{50} 分别为 3.70-5.84 d 和 3.48-5.14 d（表 2）。

2.3.2 胞外酶活性 菌株 LL-01 的 3 种胞外酶中，蛋白酶和脂肪酶活性的变化趋势相似，蛋白酶和脂肪酶活性的变化趋势基本相似，在第 5 天分别达到峰值 19.44 U/mL 和 15.01 U/mL；脂肪酶活性的上升和下降幅度则相对较为平稳，在第 6 天达到峰值 7.68 U/mL（图 5）。

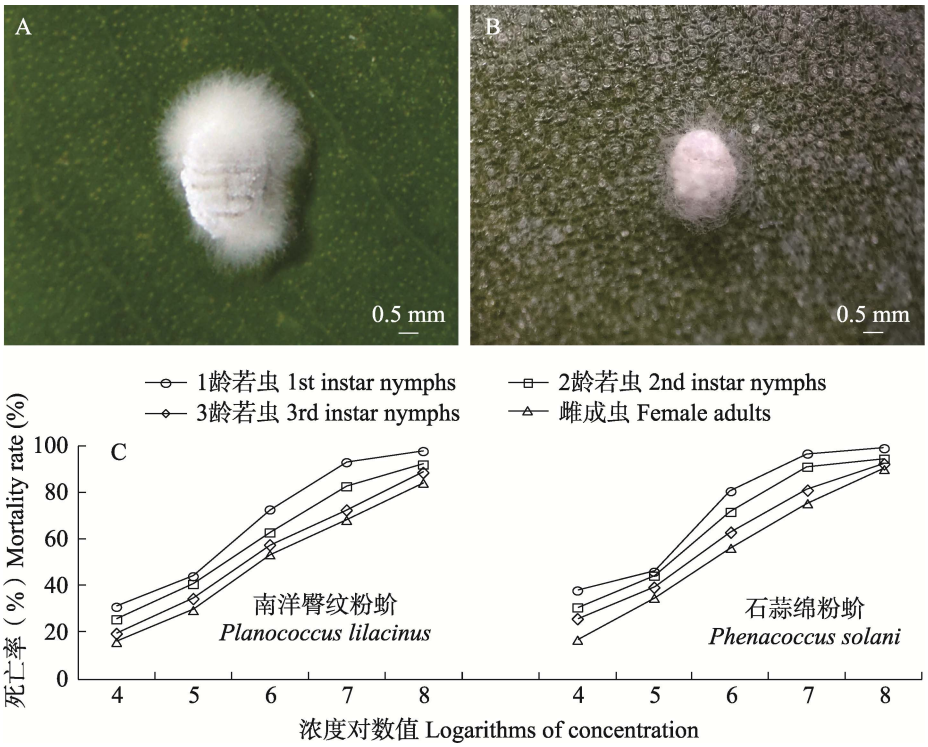

图 4　菌株 LL-01 对南洋臀纹粉蚧（A）和石蒜绵粉蚧（B）的侵染及 2 种粉蚧受侵染 10 d 后的死亡率（C）

Fig. 4　*Planococcus lilacinus* (A) and *Phenacoccus solani* (B) infected by strain LL-01, the mortality rate of two mealybugs after ten days infection (C)

表 1　侵染 10 d 后菌株 LL-01 对南洋臀纹粉蚧和石蒜绵粉蚧的 LC_{50}

Table 1　LC_{50} of strain LL-01 against *Planococcus lilacinus* and *Phenacoccus solani* after ten days infection

供试虫源 Test insects	致死中浓度（95%置信区间）（1×10^5 孢子/mL） LC_{50} (95% confidence interval) (1×10^5 conidia/mL)			
	1 龄若虫 1st instar nymphs	2 龄若虫 2nd instar nymphs	3 龄若虫 3rd instar nymphs	雌成虫 Female adults
南洋臀纹粉蚧 *Planococcus lilacinus*	0.98（0.44-1.83）	2.18（1.04-4.05）	5.24（2.74-9.53）	9.71（5.26-17.85）
石蒜绵粉蚧 *Phenacoccus solani*	0.50（0.20-0.99）	1.04（0.47-1.96）	2.31（1.14-4.20）	5.30（2.94-9.15）

表 2　侵染 10 d 后菌株 LL-01 对南洋臀纹粉蚧和石蒜绵粉蚧的 LT_{50}

Table 2　LT_{50} of strain LL-01 against *Planococcus lilacinus* and *Phenacoccus solani* after ten days infection

供试虫源 Test insects	浓度（孢子/mL）) Concentration (conidia/mL)	致死中时间（95%置信区间）（d）LT_{50} (95% confidence interval) (d)			
		1 龄若虫 1st instar nymphs	2 龄若虫 2nd instar nymphs	3 龄若虫 3rd instar nymphs	雌成虫 Female adults
南洋臀纹粉蚧 *Planococcus lilacinus*	1×10^6	5.78（4.76-7.04）	6.68（5.46-8.18）	7.50（6.11-9.22）	7.69（6.18-9.56）
	1×10^7	4.32（3.70-5.04）	5.60（4.97-6.32）	6.49（5.35-7.89）	6.61（5.38-8.12）
	1×10^8	3.70（3.14-4.36）	4.76（4.17-5.42）	5.66（4.80-6.68）	5.84（4.88-6.99）
石蒜绵粉蚧 *Phenacoccus solani*	1×10^6	5.43（4.64-6.35）	6.39（5.45-7.50）	7.40（6.06-9.05）	7.47（5.97-9.34 ）
	1×10^7	3.99（3.47-4.60）	4.94（4.37-5.58）	6.00（5.01-7.20）	6.31（5.22-7.62）
	1×10^8	3.48 （2.96-4.10）	4.56（4.08-5.09）	4.98（4.56-5.44）	5.14（4.68-5.66）

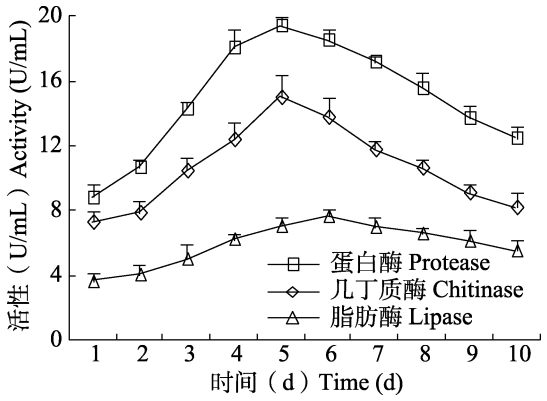

图 5 菌株 LL-01 的胞外酶活性动态

Fig. 5 Activities dynamic of extracellular enzymes of strain LL-01

3 讨论

虫生真菌具有种类多、侵染传播能力强、对天敌相对安全且寄主不易产生抗性等优点，但目前用于防治害虫的仅 10 余种，可供开发的潜力巨大（刘振邦，2011）。菌种资源收集和鉴定是挖掘虫生真菌进行害虫生物防治的基础（何恒果等，2004）。本研究从感病死亡的南洋臀纹粉蚧上分离得到 1 株编号为 LL-01 的虫生真菌，经形态观察和分子鉴定确定为蜡蚧轮枝菌。蜡蚧轮枝菌地理分布和寄主范围均比较广泛，目前已有一些菌株被挖掘尝试用于防控介壳虫，如赵玉梅等（2008）发现菌株 VR 湿地松粉蚧 *Oracella acuta* 具有较好的控制效果，刘卫敏（2009）发现菌株 V3.4504 和 V3.4505 分别对褐软蚧 *Coccus hesperidum* 和日本龟蜡蚧 *Ceroplastes japonicas* 具有良好的侵染性，袁盛勇等（2007，2016）发现菌株 MZ041024 对吹绵蚧 *Icerya purchasi* 和扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis* 均具有较强的致病力。可见，菌株 LL-01 具有的生物防治潜力和应用前景。

菌株生长速度及产孢量等生长特性是衡量虫生真菌的重要指标，主要受温度、光照、碳源和氮源等条件影响（侯颖等，2015）。因此，明确虫生真菌生长和产孢的最适条件，获得菌株最快生长和最高产孢量，对其生产和应用意义重大（黄鹏等，2018）。蜡蚧轮枝菌不同菌株间的生长特性存在差异，如徐力文等（2006）发现 KM 9803 生长和产孢最适的温度为 25 ℃；李锋等（2004）发现菌株 AC3.4505 生长和产孢最适的温度、光周期分别为 25 ℃和 24L∶0D；刘春来等（2013）发现菌株 V1-V6 生长和产孢适宜的碳源为葡萄糖，氮源为酵母膏；姜灵（2018）发现 JMC-01 和 JMC-02 生长和产孢最适的碳源为蔗糖，氮源为蛋白胨；而本研究发现菌株 LL-01 生长和产孢最适的温度为 26 ℃，光周期为 6L∶18D，碳源为果糖，氮源为干酪素，这些菌株间的生长特性差异可能是由于其地理和寄主来源不同所致。

致病力是衡量虫生真菌生防潜力和应用前景的重要指标（黄鹏等，2018）。本研究发现蜡蚧轮枝菌 LL-01 对不同虫龄南洋臀纹粉蚧的累计致死率、LC_{50} 和 LT_{50} 最终分别可达 84.09%-97.62%、9.80×10^4-9.17×10^5 孢子/mL 和 3.70-5.84 d，与 Huang 等（2021）利用金龟子绿僵菌 FM-03 侵染南洋臀纹粉蚧的效果类似；对石蒜绵粉蚧的累计致死率、LC_{50} 和 LT_{50} 最终分别可达 89.89%-98.85%、5.00×10^4-5.30×10^5 孢子/mL 和 3.48-5.14 d，这与黄鹏等（2019）利用金龟子绿僵菌 F061 和 FM-03 侵染石蒜绵粉蚧的效果类似，菌株种类不同而致病力相似可能是由于虫生真菌的侵染过程和致病机制相似所致。而蛋白酶、几丁质和脂肪酶等胞外酶活性值大小被认为是决定虫生真菌致病力的主要因素之一（林海萍等，2008；李燕翠等，2014）；本研究发现蜡蚧轮枝菌 LL-01 蛋白酶和几丁质酶活性变化幅度较大，到达峰值的时间较短，推测这应该是菌株 LL-01 能够有效突破 2 种检疫性粉蚧体壁中实现侵染致死的主要原因；而脂肪酶活性虽然到达峰值的时间稍长，但变化幅度相对较平稳，推测这可能是菌株 LL-01 能够持续突破和瓦解 2 种检疫性粉蚧体壁的另一个重要原因。可见，蜡蚧轮枝菌 LL-01 对南洋臀纹粉蚧和石蒜绵粉蚧具有强的侵染致病活性，可用于这 2 种粉蚧的生物防治，研究结果丰富了 2 种检疫性粉蚧的生物防治微生物资源，也推动了蜡蚧轮枝菌等虫生真菌在粉蚧生物防治中的应用。

虫生真菌是生物农药的重要组成部分，只有

在室内和田间对目标害虫均表现出良好侵染效果的菌株，才具有生物防治的应用价值。因此，本研究后续将进一步验证蜡蚧轮枝菌 LL-01 对南洋臀纹粉蚧和石蒜绵粉蚧的田间防效，探讨该菌株的室内发酵方式及继代培养、保存方法，以开发出相应的生防产品，并延缓菌种退化和生防效价降低的问题，为利用虫生真菌防控这 2 种检疫性粉蚧及其他害虫提供技术支持。

致谢：本研究采集的南洋臀纹粉蚧和石蒜绵粉蚧承蒙北京林业大学武三安教授帮助鉴定，深表感谢！

参考文献 (References)

Ben-Dov Y, 1994. A Systematic Catalogue of the Mealybugs of the World (Insecta: Homoptera: Coccoidea: Pseudococcidae and Putoidae) with Data on Geographical Distribution, Host Plants, Biology and Economic Importance. Andover UK: Intercept Limited. 686.

Ben-Dov Y, 2005. The Solanum mealybug, *Phenacoccus solani* Ferris (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae), extends its distribution range in the mediterranean basin. *Phytoparasitica*, 33(1): 15–16.

He HG, Li ZY, Chen B, Wen LZ, 2004. Current status in basic and applied research on entomopathogenic fungi for pest management. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 19(2): 167–173. [何恒果, 李正跃, 陈斌, 文良柱, 2004. 虫生真菌对害虫防治的研究与应用. 云南农业大学学报, 19(2): 167–173.]

Hou Y, Xia YF, Xu JQ, Liu FF, Lin XM, Du SF, 2015. Identification and biological characteristics of a *Metarhizium* strain and its virulence against oriental migratory locust. *Chinese Journal of Biological Control*, 31(3): 333–339. [侯颖, 夏彦飞, 徐建强, 刘芳芳, 林晓民, 都胜芳, 2015. 一株绿僵菌的鉴定、生物学特性及对东亚飞蝗的致病力. 中国生物防治学报, 31(3): 333–339.]

Huang BK, 1999. Fauna of Insects in Fujian Province of China. Vol. 2. Fuzhou: Fujian Science and Technology Publishing House. 678–679. [黄邦侃,1999. 福建昆虫志. 第二卷. 福州: 福建科学技术出版社. 678–679.]

Huang P, Chen HX, Yao JA, Huang JC, Yu DY, 2019. Laboratory assessment of pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* against *Phenacoccus solani*. *Chinese Journal of Biological Control*, 35(6): 884–890. [黄鹏, 陈汉鑫, 姚锦爱, 黄建成, 余德亿, 2019. 金龟子绿僵菌对石蒜绵粉蚧的室内毒力与防治效果. 中国生物防治学报, 35(6): 884–890.]

Huang P, Yao JA, Lin YW, Yu DY, 2021. Pathogenic characteristics and infection-related genes of *Metarhizium anisopliae* FM-03 infecting *Planococcus lilacinus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 169(5): 437–448.

Huang P, Yao JA, Yu DY, 2018. Biological characteristics of *Metarhizium anisopliae* FM-03 and its infection against *Planococcus citri*. *Chinese Journal of Biological Control*, 34(6): 858–865. [黄鹏, 姚锦爱, 余德亿, 2018. 金龟子绿僵菌 FM-03 生物学特性及其对柑橘粉蚧的侵染. 中国生物防治学报, 34(6): 858–865.]

Jiang L, 2018. Biological characterizatics of *Lecanicillium Lecanii* and synergistic with insecticides to *Bemisia tabaci*. Master dissertation. Yinchuan: Ningxia University. [姜灵, 2018. 蜡蚧轮枝菌的生物学特性及与常用杀虫剂对烟粉虱的协同作用. 硕士毕业论文. 银川: 宁夏大学.]

Kouvelis VN, Ghikas DV, Typas MA, 2004. The analysis of the complete mitochondrial genome of *Lecanicillium muscarium* (synonym *Verticillium lecanii*) suggests aminimum common gene organization in mtDNAs of sordariomycetes: Phylogenetic implications. *Fungal Genetics and Biology*, 41(10): 930–940.

Li F, Yin H, Jiang JH, Xia XM, 2004. Study on the solid culture condition of *Verticillium lecanii*. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 32(4): 57–58. [李锋, 殷华, 蒋继宏, 夏信明, 2004. 蜡蚧轮枝菌固体培养条件研究. 江苏农业科学, 32(4): 57–58.]

Lin HP, Wei JY, Mao SF, Chen X, Zhang LQ, Ma LJ, 2008. Correlation between protease, chitinase and lipase activities and virulence of *Beauveria bassiana* against *Monochamus alternatus*. *Chinese Journal of Biological Control*, 24(3): 290–292. [林海萍, 魏锦瑜, 毛胜凤, 陈喜, 张立钦, 马良进, 2008. 球孢白僵菌蛋白酶、几丁质酶、脂肪酶活性与其毒力相关性. 中国生物防治, 24(3): 290–292.]

Li YC, Zhang YF, Liu CQ, Nong XQ, Cao GC, Wang GJ, Liu YS, Zhang ZH, 2014. Correlation between extracellular enzyme activity and virulence from different transformants containing cry8E gene. *Chinese Journal of Biological Control*, 30(6): 759–765. [李燕翠, 张彦丰, 刘春琴, 农向群, 曹广春, 王广君, 刘玉升, 张泽华, 2014. 绿僵菌不同转化子毒力差异与胞外酶的相关性分析. 中国生物防治学报, 30(6): 759–765.]

Liu CL, Wang S, Li XM, Liu XL, Xia JX, Yang F, Ma L, 2013. Research on carbon and nitrogen sources of *Verticillium lecanii* cultured on solid matrix. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 41(32): 12595–12596, 12599. [刘春来, 王爽, 李新民, 刘兴龙, 夏吉星, 杨帆, 马玲, 2013. 蜡蚧轮枝菌的碳·氮营养源研究. 安徽农业科学, 41(32): 12595–12596, 12599.]

Liu WM, 2009. Study on histopathology of scale insects infected by

Lecanicillium lecanii. Master dissertation. Taiyuan: Shanxi University. [刘卫敏, 2009. 蚧虫受蜡蚧轮枝菌感染的组织病理学研究. 硕士毕业论文. 太原: 山西大学.]

Liu ZB, 2011. Expression of *Cry1Ac* gene in entomogenous fungus *Beaveria bassiana*. Master dissertation. Hefei: Anhui Agricultural University. [刘振邦, 2011. 苏云金芽孢杆菌晶体杀虫蛋白Cry1Ac基因在虫生真菌球孢白僵菌中的表达. 硕士毕业论文. 合肥: 安徽农业大学.]

Lomer CJ, Bateman RP, Johnson DL, Langewald J, Thomas M, 2001. Biological control of locusts and grasshoppers. *Annual Review of Entomology*, 46: 667–702.

Lu LM, Cheng BP, Du, DC, Hu XR, Peng AT, Pu ZX, Zhang XY, Huang ZD, Chen GQ, 2015. Morphological, molecular and virulence characterization of three *Lencanicillium* species infecting Asian citrus psyllids in Huangyan citrus groves. *Journal of Invertebrate Pathology*, 125: 45–55.

Ministry of Agriculture and Rural Affairs, 2007. Announcement No. 862 of the ministry of agriculture and rural affairs. [2020-12-13]. http://www.moa.gov.cn/ztzl/zwjy_1/200706/t20070605_828749.htm. [中华人民共和国农业部, 2007. 中华人民共和国农业部公告第 862 号(《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》). [2020-12-13]. http://www.moa.gov.cn/ztzl/zwjy_1/200706/t20070605_828749.htm.]

Pan YJ, Cui XH, Shao Y, Shang HW, 2020. Biological characteristics of the solanum mealybug, *Phenacoccus solani* (Hemiptera: Coccoidea), on seven succulent plants. *Acta Entomologica Sinica*, 63(10): 1223–1233. [潘颖佳, 崔旭红, 邵崟, 商晗武, 2020. 石蒜绵粉蚧在七种多肉植物上的生物学特性. 昆虫学报, 63(10): 1223–1233.]

Pu ZL, Li ZZ, 1996. Education Insect Mycology. Hefei: Anhui Science & Technology Publishing House Press. 252–256. [蒲蛰龙, 李增智, 1996. 昆虫真菌学. 合肥: 安徽科学技术出版社. 252–256.]

Song XB, Peng AT, Cheng BP, Ling JF, Chen X, Zhang LH, 2017. Isolation and identification of a *Beauveria bassiana* strain infecting *Diaphorina citri*. *Plant Protection*, 43(4): 139–144. [宋晓兵, 彭埃天, 程保平, 凌金锋, 陈霞, 张炼辉, 2017. 一株侵染柑橘木虱的球孢白僵菌的分离及鉴定. 植物保护, 43(4): 139–144.]

Wang JJ, Bai WW, Zhou W, Liu J, Chen J, Liu XY, Xiang TT, Liu RH, Wang WH, Zhang BL, 2017. Transcriptomic analysis of two *Beauveria bassiana* strains grown on cuticle extracts of the silkworm uncovers their different metabolic response at early infection stage. *Journal of Invertebrate Pathology*, 145: 45–54.

Xie T, Jing LL, Zhang XX, Zhang Y, Ma Y, Jiang L, Wang XP, Jia YX, 2020. Compatibility of 8 common pesticides with *Lecanicillium lecanii* JMC-01 and the toxicity of different pesticide-*L. lecanii* combinations toxicity to *Bemisia tabaci* nymphs. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 57(3): 682–689. [谢婷, 景亮亮, 张晓霞, 张英, 马跃, 姜灵, 王新谱, 贾彦霞, 2020. 八种常用农药与蜡蚧轮枝菌 JMC-01 的相容性及对烟粉虱若虫的毒力测定. 应用昆虫学报, 57(3): 682–689.]

Xu LW, Zhou TX, Geng RM, Yang ML, 2006. A study of biological character of *Verticillium lecanii* KM9803 strain isolated from Kunming. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 21(1): 42–47. [徐力文, 周天雄, 耿瑞梅, 杨美林, 2006. 蜡蚧轮枝菌昆明菌株的生物学特性研究(一)——温度对菌落生长、产孢量和分生孢子萌发率的影响. 云南农业大学学报. 21(1): 42–47.]

Yuan SY, Kong Q, Zhang H, Li ZY, Chen B, Zhu CY, 2007. Laboratory assessment of the virulence of *Verticillium lecanii* Viegas to *Trialeurodes vaporariorum* and *Icerya purchasi* Maskeli. *Journal of Southwest China Normal University* (*Nat. Sci.*), 32(1): 111–114. [袁盛勇, 孔琼, 张虹, 李正跃, 陈斌, 朱春燕, 2007. 蜡蚧轮枝菌 MZ041024 菌株对温室白粉虱和吹棉蚧的室内毒力. 西南师范大学学报(自然科学版), 32(1): 111–114.]

Yuan SY, Yan PF, Kong Q, Deng YL, Zhang HR, Liu ZX, He HF, 2016. Study on virulence of *Verticillium lecanii* against *Phenacoccus solenopsis* Tinsley. *Natural Enemies of Insects*, 38(4): 748–754. [袁盛勇, 闫鹏飞, 孔琼, 邓裕亮, 张宏瑞, 刘正喜, 何红飞, 2016. 蜡蚧轮枝菌对扶桑绵粉蚧的致病性研究. 环境昆虫学报, 38(4): 748–754.]

Zhao YM, Tang C, Lan CY, 2008. Study on the control effect of the *Verticillium lecanii* on *Oracella atuta*. *Journal of Shandong Agricultural University* (*Nat. Sci.*), 39(2): 183–187. [赵玉梅, 汤才, 蓝翠钰, 2008. 蜡蚧轮枝菌对湿地松粉蚧的控制作用研究. 山东农业大学学报(自然科学版): 39(2): 183–187.]

Zheng SZ, Gao Y, Fan XH, 2015. Risk analysis of *Phenacoccus solani* spread into China. *China Plant Protection*, 35(4): 75–77. [郑斯竹, 高渊, 樊新华, 2015. 石蒜绵粉蚧传入我国风险分析. 中国植保导刊, 35(4): 75–77.]