引起草地贪夜蛾流行病的莱氏绿僵菌 SZCY200812 菌株的生物学特性研究*

薛 锐[1**] 陈诗涵[1**] 沈云峰[2] 付玉飞[1] 黎 斌[3] 肖文祥[2]
孟继枝[2] 金思彤[1] 代 鑫[1] 杜广祖[1***] 陈 斌[1***]

（1. 云南农业大学植物保护学院，云南生物资源保护与利用国家重点试验室，昆明 650201；
2. 云南省保山市植保植检站，保山 678000；3. 云南省师宗县植保植检站，师宗 655700）

摘 要 **【目的】** 弄清分离自云南省师宗县玉米田罹病草地贪夜蛾幼虫的莱氏绿僵菌 SZCY200812 菌株的生物防治潜力。**【方法】** 以菌落生长速率及单位面积产孢量作为评价指标，研究该菌株在不同培养基、温度、光周期条件下的生长情况；以分生孢子萌发率为评价指标，评价菌株在不同培养条件下所产分生孢子的抗逆性。**【结果】** 莱氏绿僵菌 SZCY200812 菌株对草地贪夜蛾具有较强的侵染致病作用，在 1×10^8 孢子/mL 孢子悬浮液分别处理 3 龄及 5 龄幼虫后，分别在第 6 天和第 8 天时累积死亡率达到 100%，LT_{50} 分别为 3.89 和 4.66 d；在 SMAY 培养基上于 25 ℃、L∶D=24∶0 条件下，该菌落直径日增长量达（1.68±0.01）mm/d，产孢量为（8.05±0.37）$\times10^7$ 孢子/mm^2；在适宜培养条件下所产分生孢子对胁迫温度及紫外线胁迫时间的最大耐受值分别为 70 ℃及 12 min，在此条件下将所产分生孢子配制为 1×10^8 孢子/mL 孢子悬浮液处理 3 龄草地贪夜蛾幼虫的 LT_{50} 为 3.26 d。**【结论】** 莱氏绿僵菌 SZCY200812 适宜在 SMAY 培养基上于 25 ℃、L∶D=24∶0 条件下生长，所产分生孢子温度耐受能力、紫外线耐受能力及致病力均为最强，在莱氏绿僵菌生防制剂开发中具有良好潜力。

关键词 莱氏绿僵菌；草地贪夜蛾；生物学特性；致病力；抗逆性

Biological characteristics of the *Metarhizium rileyi* SZCY200812 fungal strain responsible for an epidemic in *Spodoptera frugiperda*

XUE Rui[1**] CHEN Shi-Han[1**] SHEN Yun-Feng[2] FU Yu-Fei[1]
LI Bin[3] XIAO Wen-Xiang[2] MEM Ji-Zhi[2] JIN Si-Tong[1]
DAI Xin[1] DU Guang-Zu[1***] CHEN Bin[1***]

(1. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan, Kunming 650201, Chian; 2. Plant Protection and Inspection Station of Baoshan City in Yunnan Province, Baoshan 678000, China; 3. Plant Protection and Inspection Station of Shizong County in Yunnan Province, Shizong 655700, China)

Abstract **[Objectives]** To investigate the potential of using the fungal strain *Metarhizium rileyi* SZCY200812, isolated from infected *Spodoptera frugiperda* larvae in corn fields in Shizong county, Yunnan province, as a biological control for *S. frugiperda*. **[Methods]** The growth rate and spore yield per unit area of the SZCY200812 strain were measured to evaluate its growth under different conditions. Its tolerance for different environmental factors was assessed based on the conidial germination rate. **[Results]** *M. rileyi* SZCY200812 was highly virulent to *S. frugiperda* larvae; cumulative mortality of 3rd and 5th larval instars reached 100 % after 6 d and 8 d, respectively, with respective LT_{50} values of 3.89 d and 4.66 d, respectively. The mycelial growth rate of *M. rileyi* SZCY200812 cultured on SMAY medium at 25 °C and L∶D=24∶0 was (1.68±0.01) mm/d on the 15th day, and the spore yield per unit area was (8.05±0.37) × 10^7 conidia/mm^2. The maximum

*资助项目 Supported projects：国家重点研发计划课题（编号：2021YFD1400705）
**共同第一作者 Co-first authors，E-mail：ruixue0122@126.com；chenc.victor@foxmail.com
***共同通讯作者 Co-corresponding authors，E-mail：chbins@163.com；duguangzu1986@163.com
收稿日期 Received：2022-10-03；接受日期 Accepted：2023-06-07

thermal and UV tolerances of SZCY200812 were 70 ℃ and 12 min, respectively. The temperature and UV tolerance of conidia produced under these conditions were the best. Under these conditions, the LT_{50} of 3rd instar larvae treated with a conidial suspension of 1×10^8 spores/mL was 3.26 d. **[Conclusion]** The SZCY200812 strain is more tolerant to short-term exposure to high temperature and ultraviolet radiation than other *M. rileyi* strains, and could therefore be used to develop an additional biological control agents for this pest.

Key words *Metarhizium rileyi*; *Spodoptera frugiperda*; biological characteristics; pathogenicity; resistance

草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda*（J.E.Smith）又名秋粘虫，隶属于鳞翅目 Lepidoptera，夜蛾科 Noctuidae。此害虫原产于美洲热带及亚热带地区，主要为害禾谷类作物（Johnson，1987）。于 2018 年 12 月首次在我国云南普洱发现（陈辉等，2020; Li *et al*., 2020），该虫寄主范围广、适生区域大、突发危害重（郭井菲等，2018；Montezano *et al.*，2018）。目前对于该害虫的防治过度依赖于化学农药，导致该虫已对多种化学农药产生了较强的抗药性（刘刚，2019；吴超等，2019），且化学农药的残留亦对环境以及人畜健康造成严重威胁（Blanco *et al.*，2010）。因此，利用生物防治手段对草地贪夜蛾进行防控十分必要。

昆虫病原真菌是一类寄生于昆虫体表或体内，可导致昆虫发病死亡的真菌（Cruz-Avalos *et al.*，2018），因其具有自然流行性、环境友好等特点，在害虫综合治理中有很大的开发潜力和应用前景（Ambethgar，2009；黄姗等，2018）。由于昆虫病原真菌物种的多样性，导致其生物学特性和致病能力各不相同，开展昆虫病原真菌致病力研究是开发利用的重要基础。莱氏绿僵菌 *Metarhizium rileyi* 是一种重要的昆虫病原真菌（Kepler，2014），但同种的不同菌株在不同营养物质上生长发育能力存在差异，如杨淑仪等（2016）和郑亚强等（2019）研究表明莱氏绿僵菌 Nr5772 菌株适宜在麦芽糖萨氏培养基（SMAY）上生长，而莱氏绿僵菌 ZYSP190701 则适宜在萨氏培养基（SDAY）上生长速度较慢。此外，温度、湿度、光照及紫外线等外界环境条件也是影响昆虫病原真菌活力的重要因素（孔琼等，2010）。涂增等（2006）研究表明在全光照条件下莱氏绿僵菌的产孢能力显著强于经过连续黑暗处理的产孢能力，且间歇光周期最有利于该菌的产孢。高毒力生防真菌的筛选不仅单独依据致病力作为单一指标，其中耐高温、耐干旱、抗紫外线能力亦需要综合评估（郑亚强等，2019；雷妍圆等，2020）。

因此，筛选莱氏绿僵菌 SZCY200812 菌株适宜培养条件并对各条件所产分生孢子进行抗逆性以及致病力测定可为草地贪夜蛾生防菌株的培养提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

莱氏绿僵菌 SZCY200812 菌株分离自云南省曲靖市师宗县彩云镇玉米田（104°5′3″N，24°29′25″E，海拔 1 341 m）罹病草地贪夜蛾幼虫，在云南农业大学植物保护学院昆虫病原体实验室保存。

1.2 供试培养基

采用 PDA、SDAY 和 SMAY 3 种培养基（蒲蛰龙和李增智，1996）。

1.3 菌株培养特征观察

将分离纯化的 SZCY200812 菌株采用点接法，接种于直径为 9 cm 的 SMAY 平板培养基上，置于温度（25±1）℃、相对湿度（75±5）%、光周期 L：D=12：12 的人工气候箱中培养，观察记录菌落颜色与形态特征；培养 3-4 d 后挑取菌丝，在光学显微镜下观察菌株的菌丝和分生孢子梗形态；7-9 d 后挑取成熟分生孢子观察分生孢子的形态与大小。

1.4 致病力测定

采用浸渍法处理草地贪夜蛾 3 龄幼虫，在浓度为 1×10^8 孢子/mL 的菌悬液中浸渍 10 s 后挑

出，用灭菌滤纸吸干虫体多余水份后，移至皿底垫有湿润滤纸片的培养皿（d=6 cm）内单头饲养（1 头/皿），皿内每日更换新鲜玉米叶供其取食，以 0.05% Tween-80 无菌水作为对照组（Husseini，2018）。将处理后的幼虫置于温度为（25±1）℃，相对湿度（80±5）%，光周期为 L：D=12：12 的人工气候箱中饲养。接种处理后每天定时连续观察直至其化蛹，并记录幼虫死亡数量，对死亡后的幼虫进行单头保湿培养观察，待死亡虫体表面长出白色菌丝或翠绿色分生孢子时则确定为被莱氏绿僵菌侵染致死。每个处理 24 头幼虫，重复 3 次。

1.5　生物学特性测定

1.5.1　培养基对菌株生长和产孢的影响　采用灭菌后的打孔器（直径=5 mm）打取培养 7 d 且生长情况良好的莱氏绿僵菌菌饼，将菌饼接入上述供试培养基中心，置于（25±1）℃，相对湿度为（75±5）%，光周期为 L：D=12：12 培养箱内。自第 3 天起，采用十字交叉法测量菌落的横纵直径并计算菌落生长速率。用灭菌后的打孔器（直径=5 mm）自菌落的中心点至边缘距离的 1/2 处打孔，将所截取的菌饼置于含有 10 mL 0.05% Tween-80 无菌水的三角瓶中，磁力搅拌 10 min，充分震荡后获得孢子悬液。用微量移取器吸取混匀的孢子悬浮液，用血球计数板计数，以 10 倍进行稀释至血球计数板可数为止，计算各个条件下菌落单位面积产孢量（侯颖等，2015；冯连荣等，2019），每个处理重复 5 次。

1.5.2　温度对菌株生长和产孢的影响　将莱氏绿僵菌菌饼接入由 1.4.1 中选出的适宜培养基的中心，之后分别置于温度为 20、25 和 30 ℃，光周期 L：D=24：0 培养箱内，每天定时观察并记录菌落直径，测定其生长速率。培养 15 d 后，按上述 1.4.1 方法测定产孢量，每个处理重复 5 次。

1.5.3　光周期对菌株生长和产孢的影响　将莱氏绿僵菌菌饼接入适宜培养基中心，置于上述筛选出适宜培养温度不同光周期 L：D=24：0、L：D=12：12、L：D=0：24 的培养箱内，定时观察其菌株横纵直径并测定其生长速率，并按上述 1.4.1 方法测定产孢量。每个处理重复 5 次。

1.6　菌株 SZCY200812 菌株的抗逆性测定

1.6.1　耐热能力测定　在林健文等（2009）方法的基础上作了改进，将上述各处理分生孢子转入装有 1 mL 无菌水的 5 mL 已灭菌离心管中，配制浓度为 1×10^7 孢子/mL 菌悬液，分别置于 30、40、50、60 和 70 ℃恒温水浴锅中，水浴处理 2 min 后吸取 1 mL 接种于已制备好 100 mL 的 SDY 培养液中，置于温度为（25±1）℃、转速 180 r/min、L：D=24：0 摇床上，培养 120 h，每隔 12 h 取样一次，测定分生孢子萌发率（杨帆等，2018），每个处理重复 5 次。

1.6.2　紫外线耐受能力测定　参考孔琼等（2010）方法，将上述各处理所产分生孢子的培养基置于 25 W 紫外灯下，分生孢子表面与灯相距 40 cm，分别照射处理 2、6 和 10 min 后，用打孔器取出各处理组菌饼，将其接入已制备好 100 mL 的 SDY 培养液中，置于温度为（25±1）℃、转速 180 r/min、L：D=24：0 摇床上振荡培养，每隔 12 h 取样一次，测定分生孢子萌发率（杨帆等，2018），每个处理重复 5 次。

1.7　数据处理及统计分析方法

菌落直径（mm）=（菌落横径+菌落纵径）/2；

菌落直径日增长量（mm/d）=平均菌落直径/培养天数；

每平方毫米菌落含孢量（conidia/mm^2）=平均每小格孢子数×400×10^4×稀释倍数/打孔器面积；

含孢量（孢子/mL）=平均每小格孢子数×400×10^4×稀释倍数；

萌发率（%）=萌发的孢子数/观察孢子总数×100；

采用 Probit 方法计算致死中时（LT_{50}），死亡率（%）=（处理死亡总虫数/处理总虫数）×100；校正死亡率（%）=（处理死亡率-对照死亡率）/（100–对照死亡率）×100。

用统计软件 SPSS 22.0 进行卡方检验并利用 LSD 法进行方差分析及卡方检验比较分析菌落直径及萌发率间的差异。所有图片绘制均在

Origin 2020 中进行。

2 结果与分析

2.1 菌株形态特征

莱氏绿僵菌 SZCY200812 菌株在 SMAY 培养基上于第 6 天开始产孢，产孢后菌落由白色渐变为绿色，至第 9 天后成全绿色。营养菌丝上生长分生孢子梗，各个分支上着生数个分生孢子梗，分生孢子梗呈短圆柱形，近基部略膨大，顶部略短尖；分生孢子呈长椭圆形，表面光滑，聚集呈淡绿色，大小为 4.22 μm ×3.45 μm(图 1)。

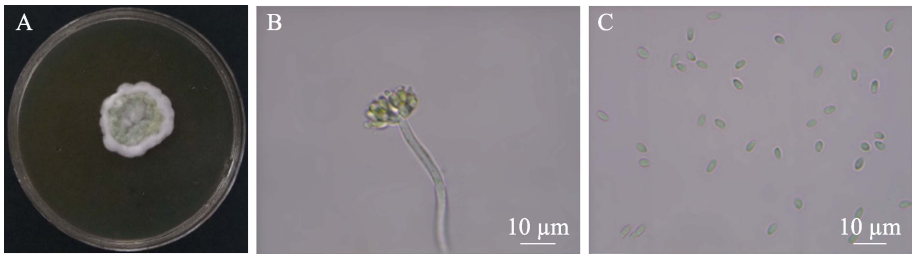

图 1 菌株 SZCY200812 的菌落和分生孢子形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of colony and conidia of *Metarhizium rileyi* SZCY200812

A. SZCY200812 菌株在 SMAY 培养基上的菌落特征; B 和 C. SZCY200812 菌株的产孢结构及分生孢子形态。

A. Morphological characteristics of *M. rileyi* SZCY200812 on SMAY medium; B and C. Sporogenous structure and conidia morphology of *M. rileyi* SZCY200812.

2.2 不同培养基对莱氏绿僵菌 SZCY200812 菌株的影响

2.2.1 培养基对菌株生长与产孢及温度耐受性的影响 SZCY200812 菌株在不同培养基上的生长情况如图 2 显示，培养第 15 天，在 SDAY、SMAY 和 PDA 培养基上生长的菌落日增长量分别为（1.25±0.04）、（1.57±0.01）和（1.04±0.03）mm/d，SMAY 培养基上菌落日直径极显著高于其余处理（F=420.14，P < 0.01）。产孢量结果显示，培养至第 15 天时，SZCY200812 菌株在 PDA、SDAY 和 SMAY 培养基上单位面积产孢量分别为(2.97±0.22)×10^7、(4.52±0.19)×10^7 和（6.17±0.30）×10^7 孢子/ mm^2，三者间差异极显著（F=218.32，P < 0.01），其中 SMAY 培养基上的产孢量最高。综合以上结果，SMAY 培养基更适宜 SZCY200812 菌株的培养。

图 3 结果表明，在 PDA、SDAY 和 SMAY 培养基上获得的 SZCY200812 菌株分生孢子对温度的耐受能力不同。SMAY 培养基上的 SZCY200812 菌株分生孢子在 40 ℃水浴处理后第 120 小时后，其孢子萌发率仍高达 75.11%±1.7 %，极显著高于其他处理（χ^2=9.66，P<0.01）。PDA 和 SDAY 无显著差异（χ^2=2.51，P > 0.05），其中 PDA 培养基上的菌株分生孢子对温度的耐受能力最弱，经 40 ℃水浴处理后，第 120 小时时孢子萌发率仅为 56.89%±3.2%。经 60 ℃处理后，于第 120 小时各处理所产分生孢子累计萌发率均受到严重影响。

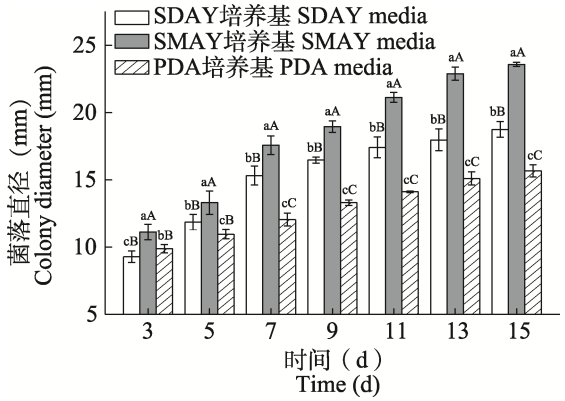

图 2 不同培养基对菌株菌丝生长的影响

Fig. 2 Effects of media on the growth of mycelium

处理间标有不同大写字母表示 0.05 水平差异显著；不同小写字母表示 0.01 水平差异显著（卡方检验）。下图同。

Date with different capital letters in the same column indicate significantly different at 0.05 level, while followed with different lowercase letters in the same column indicate significantly different at 0.01 level by χ^2 test. The same below.

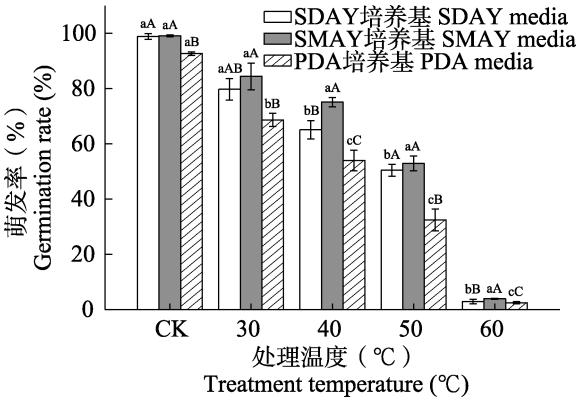

图 3　不同培养基所产分生孢子的温度耐受性

Fig. 3　Thermal tolerance of conidia from different media

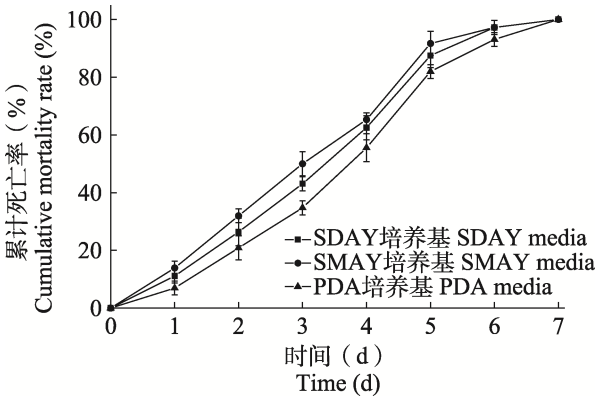

图 5　草地贪夜蛾 3 龄幼虫累计死亡率

Fig. 5　Mortality of the 3rd instar larvae of *Spodoptera frugiperda*

2.2.2　培养基对分生孢子的紫外线耐受性及毒力的影响　图 4 显示，随着紫外线胁迫时间的增加，不同培养基上的 SZCY200812 菌株分生孢子活性均呈下降趋势。经 25 W 紫外线照射 2 min 后，培养至第 120 小时发现对 SMAY 培养基上产生的分生孢子的影响相对较小，萌发率仍可达 89.78%±1.02%。照射 6 min 后，PDA 培养基所产分生孢子的萌发率明显降低仅为 60.89%±1.28%，显著低于其余处理（χ^2=6.80，$P < 0.05$）。照射 10 min 后，SMAY 培养基上产生的分生孢子累计萌发率为 10.00%±1.33%，其余处理累计萌发率均低于 5%。

图 5 显示，SZCY200812 菌株在不同培养基条件所产分生孢子对草地贪夜蛾 3 龄幼虫的致病力存在差异。其中，SMAY 培养基所产分生孢子对草地贪夜蛾 3 龄幼虫的死亡率增长速率显著高于其余处理。当浓度为 1×10^8 孢子/mL 时，SMAY 培养基所产分生孢子对草地贪夜蛾 3 龄幼虫的 LT_{50} 为 3.65 d，而在 SDAY 培养基以及 PDA 培养基上所产分生孢子的 LT_{50} 分别为 3.88 和 4.24 d。

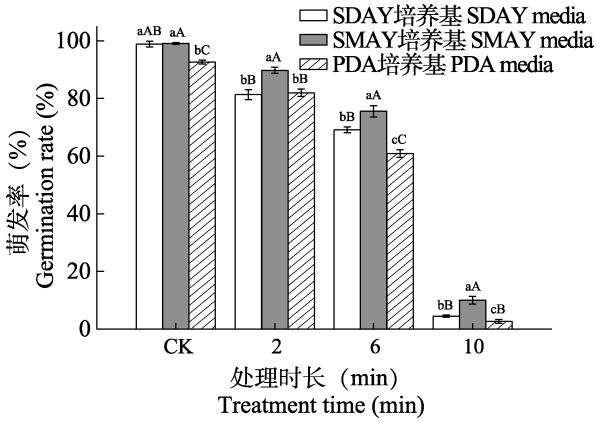

图 4　不同培养基所产分生孢子紫外线耐受性

Fig. 4　UV tolerance spores from different media

2.3　温度对莱氏绿僵菌 SZCY200812 菌株生物学特性的影响

2.3.1　不同培养温度对菌株生长与产孢及温度耐受性的影响　SZCY200812 菌株在不同温度下生长情况结果（图 6）表明，自第 5 天起，在 25 ℃条件下菌落生长直径均极显著高于其余处理（F=109.72，P<0.01）。20、25 和 30 ℃条件下菌落日增长量分别为（1.27±0.02）、（1.57±0.01）和（0.76±0.03）mm/d。产孢量结果显示，SZCY200812 菌株在 20 和 25 ℃下产孢量分别为（4.87±0.28）×10^7 和（6.34±0.65）×10^7 孢子/mm^2，其中 25 ℃下产孢量显著高于其他温度处理（F=21.77，P<0.01），30 ℃培养下，该菌株不产孢。由此表明，在 25 ℃条件下更适宜 SZCY200812 菌株生长。

图 7 结果表明，不同培养温度获得的 SZCY200812 菌株分生孢子对温度的耐受能力存在差异。其中 25 ℃条件所产 SZCY200812 菌株分生孢子，经 30 ℃水浴处理后，在第 120 小时时分生孢子累计萌发率达到 87.78%±1.35%。生长于 20 ℃条件下的分生孢子对温度耐受能力相对较弱，在相同处理下，第 120 小时时孢子萌

发率为 83.00%±1.02%；经 60 ℃水浴处理后，不同处理所产分生孢子萌发率均受到明显抑制。

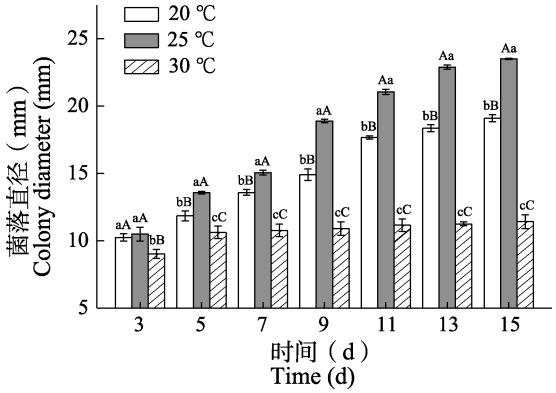

图 6　培养温度对菌株菌丝生长的影响

Fig. 6　Effects of temperature on spore germination

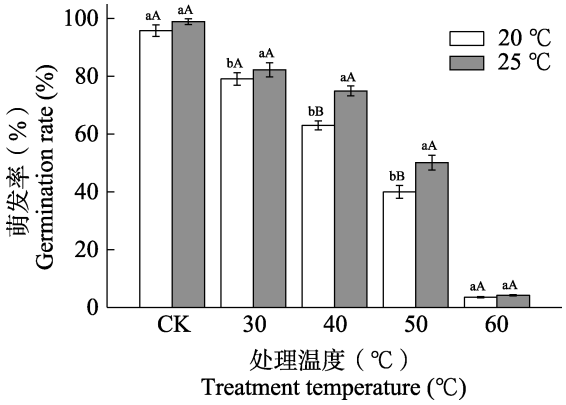

图 7　不同温度下产分生孢子温度耐受性

Fig. 7　Thermal tolerance of conidia from different temperature

2.3.2　培养温度对分生孢子的紫外线耐受性及毒力的影响　图 8 显示，不同培养温度条件所产 SZCY200812 菌株分生孢子对紫外线的耐受性存在差异。经 25 W 紫外线照射 2 min 后，对不同条件所产分生孢子的影响相对较小，两者间无显著差异；照射 6 min 后，20 ℃培养条件下产生的分生孢子萌发率明显降低，第 120 小时累计萌发率为 60.89%±2.01%；照射 10 min 后，20 ℃和 25 ℃培养条件下所产分生孢子萌发率分别降至 7.78%±0.51%和 9.88%±0.77%。

图 9 结果表明，SZCY200812 菌株在不同培养温度下所产分生孢子对草地贪夜蛾 3 龄幼虫的致病力差异不显著。当浓度为 1×10^8 孢子/mL 时，20 ℃条件下所产分生孢子对草地贪夜蛾 3 龄幼虫的 LT_{50} 为 3.49 d；25 ℃条件下所产分生孢子的 LT_{50} 分别为 3.40 d。

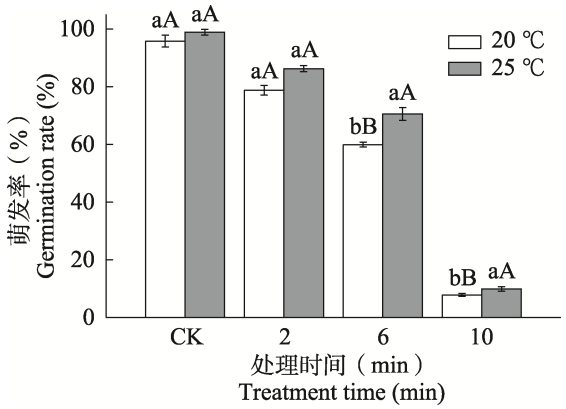

图 8　不同温度所产分生孢子紫外线耐受性

Fig. 8　UV tolerance spores from different temperatures

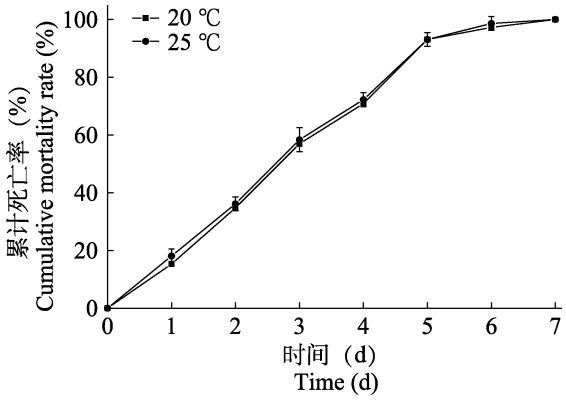

图 9　草地贪夜蛾 3 龄幼虫累计死亡率

Fig. 9　Mortality of 3rd instar larvae of *Spodoptera frugiperda*

2.4　光周期对莱氏绿僵菌 SZCY200812 生物学特性的影响

2.4.1　光周期对菌株生长与产孢及温度耐受性的影响

SZCY200812 菌株生长于不同光周期条件下的生长情况结果（图 10）表明，培养至第 15 d，生长于光周期为 L∶D=24∶0 条件下菌落直径可达到（25.3±0.12）mm，极显著高于其余处理（F=14 393.5，P<0.01）。在 L∶D=24∶0、L∶D=12∶12、L∶D=12∶12 条件下菌落日增长量分别为（1.68±0.01）、（1.51±0.01）和（0.43±0.01）mm/d。产孢量结果显示，SZCY200812 菌株在 L∶D=24

：0、L：D=12：12、L：D=0：24 条件下产孢量分别为（8.05±0.37）× 10^7、（6.38±0.69）×10^7 和（2.71±0.24）×10^7 孢子/mm^2，其中 L：D=24：0 条件下产孢量最高，极显著高于其它处理（F=166.64；P<0.01）。由此表明，全光照条件更适合 SZCY200812 菌株的生长。

图 11 显示，不同光周期条件下 SZCY200812 菌株所产分生孢子对温度的耐受能力存在差异。生长于 L：D=0：24 条件下的菌株分生孢子对温度的耐受能力较弱，经 40 ℃水浴处理后，第 120 小时时孢子萌发率为 58.78%± 1.71%，极显著低于其余处理（χ^2=8.86，P<0.05）。经 60 ℃水浴处理后，各光周期处理所产分生孢子萌发率均大幅度衰减，其中 L：D=0：24 条件所产分生孢子于第 120 小时时累计萌发率仅为 0.55%±0.19%，显著低于其余处理（χ^2=4.69，P<0.05）。

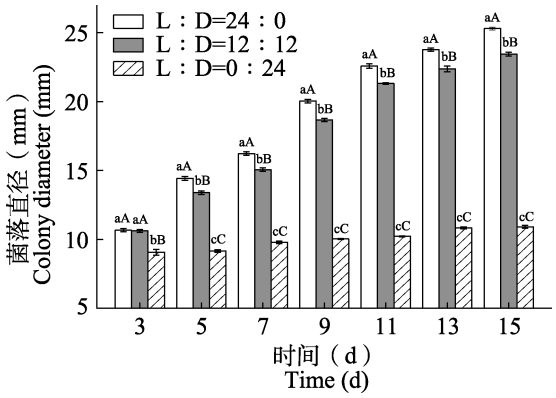

图 10　不同光周期对菌株菌丝生长的影响

Fig. 10　Effects of different photoperiod on spore germination

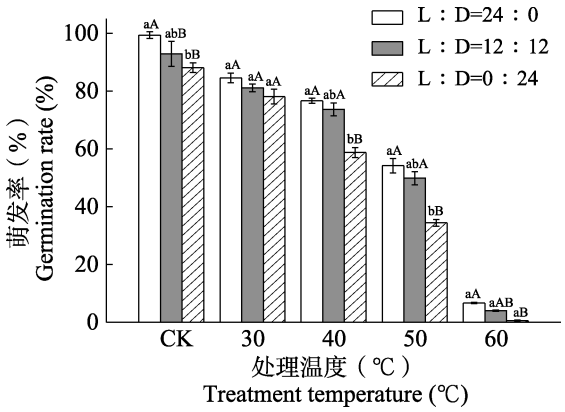

图 11　不同光周期下所产分生孢子温度耐受性

Fig. 11　Thermal tolerance of spores from different photoperiod

2.4.2　不同光周期对分生孢子的紫外线耐受性及毒力的影响　图 12 显示，SZCY200812 菌株在不同光周期条件所产分生孢子对紫外线耐受性存在差异。经 25 W 紫外线照射 2 min 后，对 L：D=24：0 条件所产分生孢子的影响相对较小，第 120 小时时萌发率仍可达 92.56%±2.91%，极显著高于同组 L：D=0：24 处理（χ^2=17.61，P<0.01）；照射 6 min 后，L：D=12：12 培养条件所产分生孢子萌发率明显降低。照射 10 min 后，L：D=24：0 及 L：D=0：24 培养条件产生的分生孢子萌发率分别为 15.22%±0.69% 和 6.11%±0.51%。

图 13 显示，不同光周期对 SZCY200812 菌株所产分生孢子的致病力存在显著影响。其中在 L：D=24：0 和 L：D=12：12 条件下所产分生孢子对草地贪夜蛾 3 龄幼虫的死亡率增长速率显

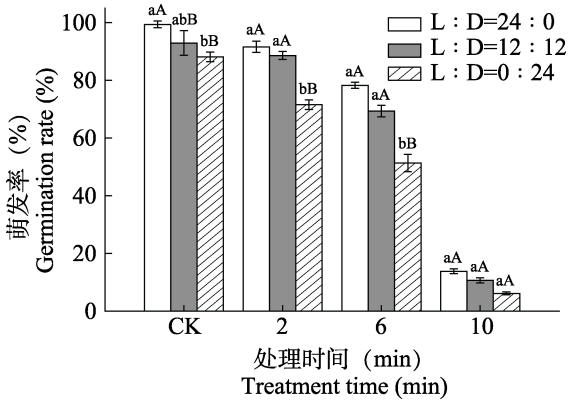

图 12　不同光周期下所产分生孢子紫外线耐受性

Fig. 12　UV tolerance spores from different photoperiod

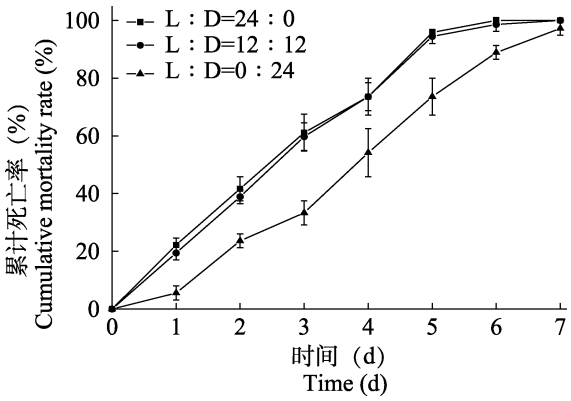

图 13　不同光周期下草地贪夜蛾 3 龄幼虫累计死亡率

Fig. 13　Mortality of 3rd instar larvae of *Spodoptera frugiperda* from different photoperiod

著高于 L：D=0：24 处理。当浓度为 1×10^8 孢子/mL 时，L：D=24：0 和 L：D=12：12 条件下所产分生孢子对草地贪夜蛾 3 龄幼虫的 LT_{50} 分别为 3.26 d 和 3.31 d；L：D=0：24 条件下所产分生孢子的 LT_{50} 为 4.40 d。

3 讨论与结论

昆虫病原真菌分生孢子的形成和萌发以及菌丝生长速率都会受到培养基、温度和光周期周期等因素的影响（Fronza *et al.*，2017），不同内在营养因子以及外界环境因子对同一菌株的影响不同，同样在内外因子相同时对不同菌株生长的影响也存在差异（Srisukchayakul *et al.*，2018）。本研究表明，培养基类型、温度以及光周期均会影响莱氏绿僵菌 SZCY200812 菌株生长、产孢量以及所产分生孢子的抗逆性。

对于昆虫病原真菌，不同营养物质会对其生长和产孢有一定程度的影响（彭小东等，2013；Patil，2015）。杨淑仪等（2016）研究发现，莱氏绿僵菌利用蛋白胨作为氮源， 菌落生长速率最快。本研究表明 SZCY200812 菌株在不同培养基的生长及产孢存在一定差异，在 SMAY 培养基上的生长速率显著比在 PDA 培养基上的高，且不同的碳氮源会造成真菌在生长方面的显著差异。不仅如此，利用麦芽糖作为唯一碳源可显著提高 SZCY200812 的产孢能力，本研究结果与此前研究结果一致，但与 Patil（2015）、吕思行等（2015）以及龙秀珍等（2021）所得结论存在一定差异。

温度是影响昆虫病原真菌生长及分生孢子产量的重要因素（涂增等，2006），本研究发现，SZCY200812 菌株在 20、25 和 30 ℃下均可生长，但菌落日增长量及单位面积产孢量间存在差异，其中 25 ℃下菌落直径及单位面积产孢量均极显著高于其余处理，该结果与 Ouedraogo 等（1997）报道的结果一致，而与涂增等（2006）研究结论 23 ℃为最适培养温度存在差异。在 30 ℃下，SZCY200812 菌落生长缓慢，第 15 天菌落直径为 11.42 mm 生长速率仅为 0.76 mm/d 极显著低于其余处理且在此条件下菌株并未产孢，此结果与崔筱（2012）报道存在差异。导致上述差异的原因可能与供试菌株地理环境或寄主昆虫的不同有关。

随着光照时间的增加， SZCY200812 菌株的产孢量也随之增高，这与 Glare（1987）的报道一致。本研究还发现，供试菌株在 L：D=0：24 条件下菌落生长缓慢，该结论与涂增等（2006）及孔琼等（2010）研究结果出现差异（涂增等，2006；孔琼等，2010），而与林华峰（1998）所得结果相一致。本次所选用的菌株对光周期的敏感性较强，主要原因为其地理位置所导致。该菌株采自海拔为 1 341 m 的云南省曲靖市，该地区全年日照总天数将近占全年的 1/3，因此该菌株生长过程中长时间处于长光周期阶段因此对光周期较为敏感。

不同培养条件所产生的莱氏绿僵菌分生孢子抗逆性均存在一定差异性，在 SMAY 培养基于 25 ℃全光照条件下所产分生孢子抗逆性最强，经 40 ℃水浴处理后，第 120 小时时分生孢子累计萌发率为 54.22%。涂增等（2006）所分离自家蚕体表的莱氏绿僵菌于 52 ℃处理后所有分生孢子均失活；孔琼等（2010）自斜纹夜蛾所分离莱氏绿僵菌，测定该菌株致死温度为 50 ℃。SZCY200812 菌株经 60 ℃水浴处理后不同条件下分生孢子仍可萌发，但经 70 ℃处理后未见孢子萌发。因此，本研究所分离自草地贪夜蛾虫体上的 SZCY200812 菌株有较高的短时高温温度耐受性，致死温度介于 60-70 ℃间。

从不同处理产生的莱氏绿僵菌分生孢子对紫外线照射的敏感性来看，SMAY 培养基上培养获得的分生孢子活力较其他培养基上的强；在 SMAY 培养基于 25 ℃全光照条件下所产分生孢子抗逆性最强，经 25 W 在紫外线处理 6 min 后，第 120 小时时分生孢子累计萌发率可达 78.22%；处理 10 min 后，第 120 小时时分生孢子累计萌发率仍可达到 13.77%。而涂增等（2006）利用 40 W 紫外线照射 8 min 后，第 68 小时时莱氏绿僵菌累计萌发率仅为 7%，孔琼等（2010）利用 25 W 紫外线照射 10 min 后莱氏绿僵菌的累计萌发率为 0。因此本研究供试的

SZCY200812 菌株有更强的紫外线耐受性，这可能也是草地贪夜蛾入侵进入云南后即被莱氏绿僵菌侵染，引起草地贪夜蛾田间自然种群的流行病。

据报道，菌株生长速率、产孢量以及萌发率等基础生物学因素均与菌株致病力存在相关关系（Moor *et al.*，1997；蔡国贵，2003）。昆虫病原真菌在寄主昆虫体表产生的附着孢造成机械压力的强弱以及生成可降解寄主昆虫体壁物质的含量均对致病力存在显著影响（Charnley，1984）。本研究发现各培养条件下所产分生孢子致病力存在一定差异，但在不同培养温度条件下致病力无明显差异，究其原因影响致病力的因素不仅是某单一因素影响，应为多因素复合影响菌株所产分生孢子致病力强弱。

SZCY200812 菌株在 SMAY 培养基上于 25 ℃、L：D=24：0 条件下培养，菌落生长速率、单位面积产孢量以及分生孢子致病力均优于其余两种处理，并且在该条件下所产分生孢子粉的温度耐受性以及紫外新耐受性均为最佳。因此明确了该菌株对外界环境因子的敏感程度以及在各处理条件下所产分生孢子对外界环境逆境的抗性以及对草地贪夜蛾 3 龄幼虫致病力，将为该菌株的生物制剂研发提供理论依据及物质基础。

参考文献 (References)

Ambethgar V, 2009. Potential of entomopathogenic fungi in insecticide resistance management (IRM): A review. *Journal of Biopesticides*, 2(2): 177–193.

Blanco CA, Portilla M, Jurat-Fuentes JL, Sánchez JF, Lugo-Barrera D, 2010. Susceptibility of isofamilies of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1Ac and Cry1Fa proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Southwestern Entomologist*, 35(3): 409–415.

Cai GG, 2003. Screening of the superior strains of *Beauveria bassiana* of *Pantana phyllostachysae* and practical application. *Scientia Silvae Sinicae*, 39(2): 102–108. [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.]

Charnley AK, 1984. Physiological Aspects of Destructive Pathogenesis in Insects by Fungi: A Speculative Review. London: Cambridge University Press. 37–55.

Chen H, Yang XL, Chen AD, Li YC, Wang DH, Liu J, Hu G, 2020. Immigration timing and origin of the first fall armyworms (*Spodoptera frugiperda*) detected in China. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 57(6): 1270–1278. [陈辉, 杨学礼, 谌爱东, 李永川, 王德海, 刘杰, 胡高, 2020. 我国最早发现为害地草地贪夜蛾的入侵时间及其虫源分布. 应用昆虫学报, 57(6): 1270–1278.]

Cruz-Avalos AM, Bivián-Hernández MDLN, Ibarra JE, Ma RC, 2018. High virulence of Mexican entomopathogenic fungi against fall armyworm, (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 112(1): 1–9.

Cui Y, 2012. The biological research and application of one entomogenous fungi-*Nomuraea rileyi*1001. Master dissertation. Zhengzhou: Henan University. [崔筱, 2012. 虫生真菌—莱氏野村菌 Nr1001 菌株的生物学研究与应用. 硕士学位论文. 郑州: 河南大学.]

Feng LR, Wang ZB, Jiao LM, Yang ZY, 2019. An entomogenous fungus: Isolation, evolutionary relationship analysis and pathogenicity determination. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 35(7): 77–82. [冯连荣, 王占斌, 矫丽曼, 杨志岩, 2019. 一株虫生真菌的分离、进化关系分析及致病性测定. 中国农学通报, 35(7): 77–82.]

Fronza E, Specht A, Heinzen H, Barros NMD, 2017. *Metarhizium* (*Nomuraea*) *rileyi* as biological control agent. *Biocontrol Science and Technology*, 27(11): 1–22.

Glare TR, 1987. Effect of host species and light conditions on production of conidia by an isolate of *Nomuraea rileyi*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 50(1): 67–69.

Guo JF, Zhao JZ, He LK, Zhang F, Wang ZY, 2018. Potential invasion of the crop-devastating insect pest fall armyworm *Spodoptera frugiperda* to China. *Plant Protection*, 44(6): 1–10. [郭井菲, 赵建周, 何康来, 张峰, 王振营, 2018. 警惕危险性害虫草地贪夜蛾入侵中国. 植物保护, 44(6): 1–10.]

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 S, Kong LN, Liu JS, 2018. Research progress of *Metarhizium rileyi*. *Industrial and Science Tribune*, 17(10): 77–78. [黄姗, 孔

丽娜, 刘加顺, 2018. 莱氏绿僵菌研究进展. 产业与科技论坛, 17(10): 77–78.]

Husseini MMM, 2019. Efficacy of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.), against larvae of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae), under laboratory conditions. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 29(1): 50–52

Johnson SJ, 1987. Migration and the life history strategy of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* in the western hemisphere. *International Journal of Tropical Insect Science*, 8(4/5/6): 534–549.

Kepler RM, Humber RA, Bischoff JF, Rehner SA, 2014. Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. *Mycologia*, 106(4): 811–829.

Kong Q, Yuan SY, Zhang ZF, Yan Y, Zhang HF, 2010. Effect of Environmental Factors on Growth of *Nomuraea rileyi* MZ060806. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 23(5): 1544–1547. [孔琼, 袁盛勇, 张自飞, 严芸, 张慧芳, 2010. 环境因子对莱氏野村菌 MZ060806 菌株生长的影响. 西南农业学报, 23(5): 1544–1547.]

Lei YY, Wang DS, Xue ZH, Lv LH, Huang SH, Zhang YP, 2020. Identification of a *Metarhizium* strain and its pathogenicity to *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Guangzhou area. *Journal of Southern Agriculture*, 51(6):1265–1273. [雷妍圆, 王德森, 薛志洪, 吕利华, 黄少华, 章玉苹, 2020. 广州地区一株绿僵菌的鉴定及其对草地贪夜蛾的致病力测定. 南方农业学报, 51(6): 1265–1273.]

Li XJ, Wu MF, Ma J, Gao BY, Wu QL, Chen AD, Liu J, Jiang YY, Zhai BP, Early R, Chapman JW, Hu G, 2020. Prediction of migratory routes of the invasive fall armyworm in eastern China using a trajectory analytical approach. *Pest Management Science*, 76(2): 454–463.

Lin HF, 1998. Research progress on entomogenous fungi. *Journal of Anhui Agricultural University*, 42(3): 43–46. [林华峰, 1998. 虫生真菌研究进展(综述). 安徽农业大学学报, 42(3): 43–46.]

Lin JW, Luo ZB, Luo XD, Zhang SH, Pei Y, Zhang YJ, 2009. An entomogenous fungus: Isolation, evolutionary relationship analysis and pathogenicity determination. *Journal of Plant Protection*, 36(5): 437–442. [林健文, 罗志兵, 骆星丹, 张素红, 裴炎, 张永军, 2009. 莱氏野村菌固体发酵培养基筛选与发酵条件优化. 植物保护学报, 36(5): 437–442.]

Liu G, 2019. *Metarhizium rileyi* has good biocontrol potential against *Spodoptera frugiperda*. *Pesticide Market News*, 2019(17): 51–51. [刘刚, 2019. 莱氏绿僵菌对草地贪夜蛾有良好的生防潜力. 农药市场信息, 2019(17): 51–51.]

Long XZ, Gao XY, Zeng XR, He Z, Wei DW, Jiang XD, Zeng T, Yu YH, 2021. Screening of a *Metarhizium rileyi* strain and its virulences to *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Chinese Journal of Biological Control*, 37(6): 1111–1119. [龙秀珍, 高旭渊, 曾宪儒, 何瞻, 韦德卫, 江小冬, 曾涛, 于永浩, 2021. 一株莱氏绿僵菌的筛选及其对草地贪夜蛾的毒力. 中国生物防治学报, 37(6): 1111–1119.]

Lv SX, Zheng CG, Jiang MH, Xu SL, Yang SJ, Tang L, Liu JP, 2015. Isolation and identification of *Nomuraea rileyi*, an entomopathogenic fungus. *Guangdong Agricultural Sciences*, 42(15): 53–56. [吕思行, 郑常格, 江敏华, 徐树兰, 杨思佳, 汤历, 刘吉平, 2015. 一株昆虫病原性真菌莱氏野村菌的分离与鉴定. 广东农业科学, 42(15): 53–56.]

Montezano DG, Specht A, Sosa-Gómez DR, Roque-Specht VF, Sousa-Silva JC, Paula-Moraes SV, Peterson, JA, Hunt TE, 2018. Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. *African Entomology*, 26(2): 286–301.

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

Ouedraogo A, Fargues J, Goettel MS, Lomer CJ, 1997. Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *Mycopathologia*, 137(1): 37–43.

Patil SD, 2015. Influence of different media on growth, biomass production, sporulation, and concentrations of liquid form of *Nomuraea rileyi* inoculums on its growth, development, and bio efficacy against *Spodoptera litura*. *International Journal of Plant Protection*, 8(2): 288–294.

Peng XD, Tang WY, LV XB, Zhao XY, Tian H, Zhang YM, 2013. Effects of different nutrient substances on growth of *Nomuraea rileyi* Nr16. *Guizhou Agricultural Sciences*, 41(2): 115–119. [彭小东, 唐维媛, 吕锡斌, 赵雪岩, 田辉, 张义明, 2013. 不同营养物质对莱氏野村菌 Nr16 生长的影响. 贵州农业科学, 41(2): 115–119.]

Pu ZL, Li ZZ, 1996. Insect Mycology. Hefei: AnHui Science Tech Publishing House. 131–139. [蒲蛰龙, 李增智, 1996. 昆虫真菌学. 合肥: 安徽科学技术出版社. 131–139.]

Srisukchayakul P, Charalampopoulos D, Karatzas KA, 2018. Study on the effect of citric acid adaptation toward the subsequent survival of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 in low pH fruit

juices during refrigerated storage. *Food Research International*, 111(5): 198–204.

Tu Z, Zhai Y, Wan YK, 2006. In vitro effects of environmental factors on the growth and conidial production and germination of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *Journal of Southwest University* (*Natural Science Edition*), 28(1): 49–53, 57. [涂增, 翟逸, 万永继, 2006. 环境因子对莱氏野村菌 cq 菌株生长发育的影响. 西南农业大学学报(自然科学版), 28(1): 49–53, 57.]

Wu C, Zhang L, Liao ZY, Wu KM, Dong YT, 2019. Research progress of resistance mechanism and management techniques of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* to insecticides and Bt crops. *Journal of Plant Protection*, 46(3): 503–513. [吴超, 张磊, 廖重宇, 吴孔明, 萧玉涛, 2019. 草地贪夜蛾对化学农药和 Bt 作物的抗性机制及其治理技术研究进展. 植物保护学报, 46(3): 503–513.]

Yang F, Liu CL, Wang S, Liu L, Li XM, 2018. Identification of *Metarhizium pingshaense* and assessing potentiality of bio-control application. *Plant Protection*, 44(5): 199–205. [杨帆, 刘春来, 王爽, 刘亮, 李新民, 2018. 一株平沙绿僵菌的鉴定及生防应用潜力评价. 植物保护, 44(5): 199–205.]

Yang SY, Wang Y, Guan QZ, Tao XP, Liu SZ, 2016. Orthogonal test optimization of media for the conidia production by *Nomuraea rileyi*. *Hubei Agricultural Sciences*, 55(23): 6164–6168. [杨淑仪, 王彦, 管清真, 陶新娉, 刘守柱, 2016. 莱氏野村菌产孢培养基的正交优化设计. 湖北农业科学, 55(23): 6164–6168.]

Zheng YQ, Hu HF, Fu YF, Jin XH, Zhang X, Yang BY, Zhang ZH, Huang ML, Li YC, Chen B, Li ZY, 2019. Isolation and identification of entomopathogenic fungi *Metarhizium rileyi* isolated from *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Plant Protection*, 45(5): 65–70. [郑亚强, 胡惠芬, 付玉飞, 金新华, 张栩, 杨宝云, 张志红, 黄明亮, 李永川, 陈斌, 李正跃, 2019. 草地贪夜蛾莱氏绿僵菌的分离鉴定. 植物保护, 45(5): 65–70.]