

几种杀虫真菌对二化螟幼虫的毒力测定与高毒力菌株的分子鉴定*

洪 勇^{1**} 林华峰^{1***} 岳霄霄¹ 刘 苏¹ 叶恭银²

(1. 安徽农业大学植物保护学院, 合肥 230036; 2. 浙江大学昆虫科学研究所, 杭州 310058)

摘 要 【目的】测定杀虫真菌对二化螟 *Chilo suppressalis* (Walker) 幼虫的室内毒力, 明确高毒力菌株的种类, 为应用杀虫真菌防治二化螟提供理论基础。【方法】采用喷雾法测定 10 株杀虫真菌在同种浓度、湿度和温度下对二化螟幼虫的室内毒力, 选择毒力最强的菌株, 利用扫描电镜观察杀虫真菌分生孢子对二化螟的侵染过程; 根据该菌株的生物学特性, 利用白僵菌 *Beauveria* sp. 18S rDNA ITS 序列进行 PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳检测和序列分析, 并在核酸序列数据库中进行同源性序列对比。【结果】真菌 YQ147、QING、Bbr14、Bbr84 在浓度为 1.0×10^8 孢子/mL 下均对二化螟幼虫具有较强的致病力, 其中真菌 YQ147 在处理后的第 10 天对二化螟累计校正死亡率达到 78.4%, LT_{50} 为 5.8 d, 分子鉴定的结果显示该菌为白僵菌属球孢白僵菌 *Beauveria bassiana*。【结论】明确了球孢白僵菌对二化螟的室内毒力最强, 这为利用其对二化螟进行生物防治提供了基础。

关键词 白僵菌, 二化螟, 分子序列, 电镜, 系统树

Virulence of several insecticidal fungi against *Chilo suppressalis* larvae and molecular identification of highly virulent strains

HONG Yong^{1**} LIN Hua-Feng^{1***} YUE Xiao-Xiao¹ LIU Su¹ YE Gong-Yin²

(1. School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2. Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract [Objectives] To identify fungal strains with high virulence to *Chilo suppressalis* larvae and provide a theoretical foundation for the biological control of *C. suppressalis*. [Methods] The virulence of 10 insecticidal fungi to *C. suppressalis* larvae were measured under the same conditions (spore concentration, temperature and humidity) in a laboratory and the infestation process of insecticidal fungal spores observed. A pair of 18S rDNA universal primers of *Beauveria* sp. were used to identify the most virulent strains. [Result] At a concentration of 1.0×10^8 spores/mL, the fungal strains YQ147, QING, Bbr14, and Bbr84 displayed strong virulence against 2nd instar larvae of *C. suppressalis*, and the YQ147 strain achieved the highest cumulative corrected mortality of 78.4% with a LT_{50} of 5.8 d after 10 d. Molecular identification confirmed that this fungus was *Beauveria bassiana*. [Conclusion] *Beauveria bassiana* is highly virulent to *C. suppressalis* and may be an effective agent for the biological control of this pest.

Key words *Beauveria bassiana*, *Chilo suppressalis*, molecular identification, electron microscope, phylogenetic tree

二化螟 *Chilo suppressalis* (Walker) 是我国水稻的主要害虫之一, 经常给我国的水稻产量造成严重损失 (Han and Wang, 2003; 韦永保等,

2005; 薛进等, 2005)。多年来, 防治二化螟主要以化学农药为主, 由于长期不合理使用、滥用化学农药, 以及用药结构不合理, 导致了抗药性

* 资助项目 Supported projects: 公益性行业 (农业) 科研专项(201303017); “十二五”农村领域国家科技计划(2011AA10A204)

**第一作者 First author, E-mail: 843029250@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: hf.lin@163.com

收稿日期 Received: 2014-04-09, 接受日期 Accepted: 2014-06-18

和环境污染、食品安全等问题日益突出 (Cao *et al.*, 2001; He *et al.*, 2005; 姚英娟等, 2013)。随着高效防治化学药剂在水田上的禁用, 因此具有杀虫潜力, 对人、畜低毒的新型生物药剂便受到普遍关注, 有的已广泛应用于卫生和农业害虫防治, 且对害虫防效十分明显 (Coppling and Duke, 2007; 黄金等, 2009; 雷妍圆等, 2010; 罗华东等, 2012)。

目前在农林害虫生物防治方面, 杀虫真菌是研究、生产和应用最多的生物类群之一, 其中白僵菌在害虫的持续控制及维护生物多样性方面所发挥的作用正越来越受到人们的关注 (Clarkson *et al.*, 1996; 付志坚等, 2000)。白僵菌 *Beauveria* sp. 是目前世界上防治害虫应用较广的一类杀虫真菌, 其杀虫谱广, 对多种农林害虫具有致死作用, 且致病力强, 防治效果好, 对环境、作物和温血动物无害, 易于培养, 原料价廉易得, 是公认的很有前途、应用最广泛的杀虫真菌 (刘健等, 2003)。众多试验证实白僵菌对桃蚜 *Myzus persicae* (方志刚等, 1999)、松毛虫 *Dendrolimus punctatus* (刘银泉等, 2000)、玉米螟 *Ostrinia nubilalis* (杨敏芝等, 2005)、木毒蛾 *Lymantria xylinia* (黄芙蓉, 2003)、小菜蛾 *Plutella xylostella* (李春香等, 2007) 等多种害虫有很强的致病性。我国应用白僵菌防治的害虫种类有 40 多种 (林华峰等, 2011), 而在防治二化螟方面暂未有明确报道。为此, 本试验采用包括球孢白僵菌等 10 个菌株对二化螟进行了室内毒力测定研究, 以期杀虫真菌在二化螟防治中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株及来源 球孢白僵菌 Bbr14、Bbr84、Qing 和拟青霉 Pf10、Nr07、PC31 由安徽农业大学昆虫研究室菌种保藏室提供; 杀虫真菌菌株 YQ147、FY324、WL324、ANJ327 是从浙江省水稻田采集的自然罹病的二化螟僵虫, 经本实验室分离纯化获得。

培养使用萨氏培养基 (SDAY): 葡萄糖 4 g, 蛋白胨 1 g, 酵母粉 1 g, 琼脂 2 g, 蒸馏水 100 mL, (25±1) °C 恒温培养箱 (RZH 型) 中培养, 待大量产孢后保存备用。

1.1.2 供试幼虫 供试二化螟幼虫采于安徽省庐江县农户未打药的水稻田, 经本实验室用茭白饲养 2 代后备用。

1.2 真菌对二化螟幼虫的毒力测定

1.2.1 真菌孢子悬浮液制备 将 10 株杀虫真菌接种在 SDAY 培养基上, 培养箱 (25±1 °C) 内恒温培养 10 d, 将分生孢子粉刮到盛有 20 mL 0.05% 吐温-80 润湿剂的试管中, 充分震荡混匀, 血球计数板检测, 均配制浓度为 1.0×10^8 孢子/mL 的悬浮液。

1.2.2 室内毒力测定 采用喷雾法进行毒力测定试验。挑取 3 龄二化螟幼虫全体喷雾后, 移入盛有茭白的指定烧杯中饲养, 置于相对温度 (26±1) °C、相对湿度 60%~80%、光照周期 14L:10D 的人工气候室中, 处理 20 头幼虫, 共计 10 个处理, 重复 3 次, 并以含 0.05% 吐温-80 的纯净水作对照, 每天观察并记录死亡情况, 连续观察 10 d。

1.2.3 扫描电镜样品制备 将感染杀虫真菌菌株 YQ147 的二化螟僵虫, 经 3% 戊二醛固定过夜, 再用磷酸缓冲液浸洗 3 次, 10 min/次, 分别用 50%、70%、80%、90% 和 100% 乙醇逐级脱水, 每级 10 min, 其中 100% 乙醇脱水 2 次, 用醛酸正戊酯置换 2 次, 每次停留 15 min。最后用 CO₂ 临界点干燥法, 干燥 2 h, 将样品取出, 粘于样品台上, 然后喷金, 在扫描电镜 (S-4800 EVACSEQ ERROR CODES) 下观察拍照。

1.2.4 数据统计与分析

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

实验数据使用 DPS 统计分析软件 (Tang and Zhang, 2013) 进行方差分析, 并采用最小显著差异法 (LSD) 进行多重比较及生物统计模型进行分析。以时间 (d) 为 X , 累积校正死亡率的几率值为 Y , 采用几率值分析法, 计算毒力回归

方程和致死中时间 (LT_{50})。

1.3 真菌基因组 DNA 的提取与分子测序鉴定

1.3.1 真菌基因组 DNA 提取

将致病力最高的杀虫真菌采用真菌基因组 DNA 快速提取试剂盒

(北京艾德莱生物科技有限公司) 提取 DNA, 琼脂糖凝胶电泳, 并在紫外线凝胶成像系统中拍照。通用引物是由上海立菲生物技术有限公司合成用于核糖体 DNA 的 ITS 区域的核苷酸引物, 引物系列为: ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTG ATATGC-3', ITS5 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAA CAAGG-3'。

1.3.2 PCR 反应体系与 PCR 方案 25 μ L 反应体系: 上游引物 4 μ L、下游引物 4 μ L、10 $\times$ PCR Buffer 10 μ L、 Mg^{2+} (2.5 mmol/L) 6 μ L、dNTP (10 mmol/L) 2 μ L、Taq DNA 聚合酶 2 μ L、ddH₂O 补齐到 70 μ L。PCR 方案: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 1 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min、56 $^{\circ}$ C 退火 1 min、72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共进行 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 1 个循环; 25 $^{\circ}$ C 降温 5 min, 1 个循环。PCR 反应完成后, 将反应产物放置于 4 $^{\circ}$ C 条件下保存, 用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测反应产物数量及分子量大小。PCR 产物回收参照林华峰等 (2011)。

1.3.3 分子测序与菌种鉴定 回收后的 PCR 产物由上海立菲生物技术有限公司测序。所得的核苷酸序列与 GenBank 已注册的基因序列进行同源性比较, 相似性达到 99% 以上方可认为是同一菌种。并利用邻接法选择已登记在册的白僵菌菌株 (Rehner *et al.*, 2011) 通过 MEGA 构建进化树, 确定该菌株所在分支, 最终鉴定其类型。

2 结果与分析

2.1 真菌对二化螟幼虫的毒力

2.1.1 真菌孢子液对二化螟 3 龄幼虫的致死效果 10 种杀虫真菌分生孢子液对二化螟 3 龄幼虫的毒力统计结果如表 1 所示, 在菌液浓度为 1.0×10^8 孢子/mL 下, 接种后第 2 天, 二化螟幼虫开始出现死亡, 但死亡率较低, 且各组死亡率差异

不明显, 随着时间的增加, 累计死亡率逐渐增加。从第 3 天开始, 菌株 YQ147、QING、Bbr14 和 Bbr84 对二化螟表现出较强的毒力, 累计校正死亡率达 20% 以上, 其中菌株 YQ147 对二化螟的毒力最强。第 4~5 天时, 菌株 YQ147、QING、Bbr14 和 Bbr84 的累计校正死亡率均在 35% 以上, 且差异不明显, 但菌株与菌株 WL324、PC31、Nr07、ANJ327、Pfl10 和 FY324 差异显著。第 6 天时, 菌株 YQ147 和 QING 出现差异显著, 但和菌株 Bbr14 和 Bbr84 差异不显著。第 7 天时, 菌株 YQ147 的累计校正死亡率达 63.0%。第 8 天时, 菌株与 Bbr14 的死亡率差异不显著, 与其他菌株的死亡率均差异显著。在第 9~10 天时, 菌株 YQ147 的累计校正死亡率达 78.4%, 第 10 天菌株 QING 的累计校正死亡率达 74.5%, 这两个菌株的累计校正死亡率在 0.05 水平上差异不显著, 但菌株 YQ147 与其他菌株差异显著。在所比较的 10 个菌株中, 菌株 YQ147 的累计校正死亡率均比其他菌株要高。

表 2 列出了 10 个菌株对二化螟幼虫的 LT_{50} , 可比较不同菌株的致死速度。表 2 显示, 菌株 YQ147 和菌株 QING 的 LT_{50} 分别是 5.8 d 和 6.3 d, 这与表 1 反映的毒力结果相一致。

从表 1 和表 2 可看出, 在所比较的 10 个菌株中, 菌株 YQ147 造成的二化螟死亡率最高、 LT_{50} 最小, 表明菌株 YQ147 对二化螟的致病力最强, 为毒力最高的菌株。因此本实验中选取菌株 YQ147, 对其进行基因测序, 据此作分子生物学鉴定。

2.1.2 杀虫真菌侵染二化螟后致病症状 对杀虫真菌感染二化螟幼虫的病症观察发现: 二化螟感染后发病初期, 虫体没有特异的情况, 形体大小和颜色均没有发生变化, 只是幼虫行为反应相对迟钝, 生命力不强; 发病后期, 虫体颜色发生变异, 不同处理组颜色不同, 如图 1 所示, 其中感染菌株 YQ147 的出现黑斑; 刚死的幼虫虫体略有弹性, 易于弯曲, 随后虫尸逐渐变硬 (图 1: A), 而感染菌株 Bbr14 的虫体体色变为浅紫褐色 (图 1: B)。将刚死的虫体挑离感染源并继

表 1 二化螟幼虫感染 10 种杀虫真菌后的累计校正死亡率
Table 1 *Chilo suppressalis* larvae cumulative corrected mortality after infected with 10 strains of insecticidal fungus

菌种 Strains	浓度 (孢子/mL) Concentration	二化螟幼虫不同感染时间累计校正死亡率 (%) <i>C. suppressalis</i> larvae infected with different time cumulative corrected mortality							
		3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d
YQ147	1.0×10 ⁸	20.0±5.8a	35.1±6.3a	43.9±3.5a	51.9±3.7a	63.0±3.7a	72.6±3.9a	78.4±2.0a	78.4±2.0a
QING	1.0×10 ⁸	20.0±7.6a	28.1±1.8a	36.8±3.0ab	44.4±0.0b	57.4±1.9ab	66.7±2.0ab	72.6±3.9ab	74.5±3.9ab
Bbr14	1.0×10 ⁸	16.7±1.7ab	29.8±1.8a	42.1±3.0ab	46.3±1.9ab	50.0±3.2b	52.9±3.4c	66.7±2.0bc	66.7±2.0bc
Bbr84	1.0×10 ⁸	20.0±5.8a	31.6±5.3a	35.1±3.5b	46.3±3.2ab	53.7±6.7ab	58.8±3.4bc	58.8±3.4c	60.8±5.2cd
WL324	1.0×10 ⁸	8.3±1.7abc	12.3±1.8b	17.5±1.8cd	20.4±1.9d	35.2±1.9c	41.2±3.4d	49.0±1.9d	52.9±2.0de
PC31	1.0×10 ⁸	3.3±3.3c	5.3±3.0bc	19.3±3.5c	27.8±3.2c	33.3±3.2cd	41.2±3.4d	47.1±3.4de	51.0±3.9ef
Nr07	1.0×10 ⁸	1.7±1.7c	3.5±1.8bc	14.0±1.8cd	18.5±1.9de	29.6±1.9cd	33.3±2.0de	45.1±1.9de	49.0±2.0ef
ANJ327	1.0×10 ⁸	3.3±1.7c	1.8±1.8c	10.5±3.0d	13.0±1.9e	24.1±1.9de	25.5±1.9e	43.1±3.9de	47.1±0.0ef
Pf10	1.0×10 ⁸	5.0±2.9bc	3.5±1.8bc	12.3±1.8cd	14.8±1.9de	22.2±3.2e	27.5±1.9e	37.3±3.9e	45.1±3.9f
FY324	1.0×10 ⁸	5.0±2.9bc	10.5±3.0bc	12.3±3.5cd	16.7±3.2de	24.1±1.9de	33.3±2.0de	37.3±2.0e	43.1±3.9f

表内数字为平均数±标准误，同一列数据后标有不同字母表示经 LSD 多重比较差异显著($P<0.05$)。
The data are mean±SE, and followed by different letters in the same column indicate significant difference ($P<0.05$) by LSD test.

表 2 不同真菌对二化螟幼虫的致死中时间
Table 2 LT_{50} of different fungi on *Chilo suppressalis* larvae

处理 Treatment	回归方程 Regression equation	相关系数 (r) Correlation coefficient	LT_{50} (d)
YQ147	$Y = 3.2641 + 0.3004X$	0.9228	5.8
QING	$Y = 3.1738 + 0.2896X$	0.9266	6.3
Bbr14	$Y = 3.2479 + 0.2621X$	0.9199	6.7
Bbr84	$Y = 3.2661 + 0.2526X$	0.9159	6.9
WL324	$Y = 2.7959 + 0.2671X$	0.9341	8.3
PC31	$Y = 2.6222 + 0.2865X$	0.9470	8.3
Nr07	$Y = 2.4099 + 0.2987X$	0.9582	8.7
ANJ327	$Y = 2.3696 + 0.2917X$	0.9549	9.0
FY324	$Y = 2.7083 + 0.2518X$	0.9367	9.1
Pf10	$Y = 2.5219 + 0.2695X$	0.9457	9.2

续培养, 经过 3~5 d 后, 幼虫虫体上长出白色气生菌丝, 并快速长出无数分生孢子, 包裹着整个虫体, 如同覆盖白粉 (图 1:A~F); 感染菌株 QING 的虫体最先长出菌丝, 菌株 YQ147 和

菌株 Bbr14 其次, 菌株 Bbr84 相对较后才长出。图 1 是二化螟感染 4 个真菌 5 d 后菌丝生长情况, 根据不同真菌形态学的比较, 初步对菌株 YQ147 进行鉴定。
2.1.3 分生孢子对幼虫体表的侵染过程 在感染菌株 YQ147 的二化螟体表, 真菌的分生孢子多分布在二化螟节间膜、体壁褶皱凹陷及体表有缝隙的薄弱部位附着。电镜照片显示: 附着体表后, 分生孢子吸水并利用二化螟体表的营养物质萌发产生芽管 (图 2:A), 而未形成侵入点的孢子可以形成菌丝在体表横向生长, 且在菌丝中间部位出现膨大结构 (图 2:B), 在体表较薄弱部位形成钉状结构, 穿透寄主表皮。在腹侧、附肢和刚毛窝附近, 孢子萌发长出芽管直接侵入表皮 (图 2:C, D), 孢子萌发的另一端则沿着体表向外生长, 孢子梗呈现扁平状 (图 2:E)。在腹部一些部位孢子侵入表皮过程中, 萌发的分生孢子的末端有膨大的附着胞结构生成, 附着胞紧贴在体壁上, 在附着胞下方形成侵入结构 (图 2:F)。

2.2 高毒力菌株的分子鉴定与系统树分析

以菌株 YQ147 的基因组 DNA 为模板, 用特

异性引物 ITS4 和 ITS5 进行 PCR 扩增, 获得 500 bp 左右的扩增产物。PCR 产物经上海立菲生物

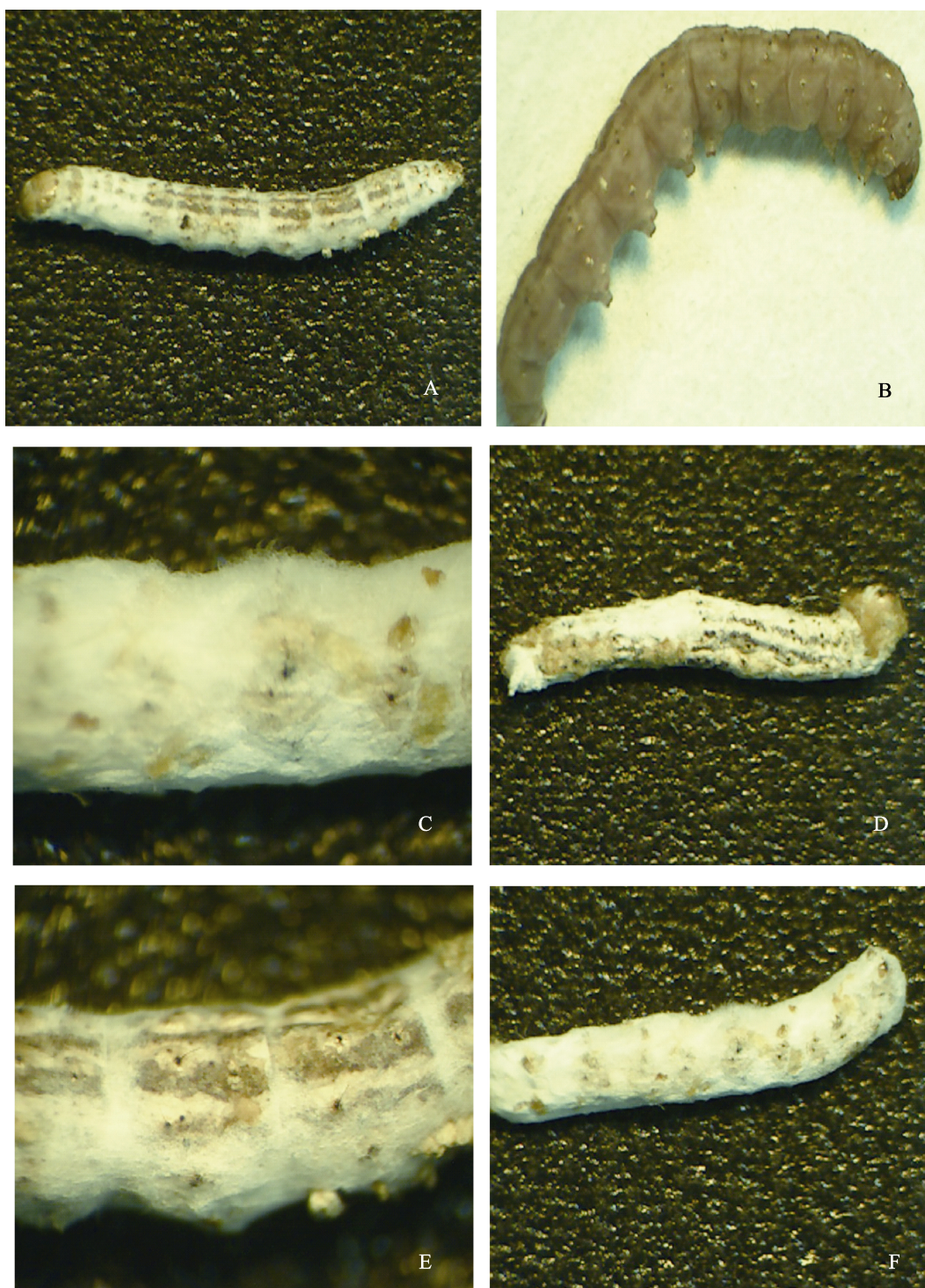


图 1 杀虫真菌感染二化螟后致病症状的观察

Fig. 1 Pathogenic symptoms observed after insecticidal fungal infect *Chilo suppressalis*

A, F 为菌株 YQ147; B 为菌株 Bbr14; C, D 为菌株 Bbr84; E 为菌株 QING。

A, F is the strain YQ147; B is the strain Bbr14; C, D is the strain Bbr84; E is the strain QING.

技术有限公司进行序列测定, 将该序列与 GenBank (NCBI) 中的球孢白僵菌菌株

AY531981、AY532045、AY531972、AY531992、AY532015 和 AY531995 序列进行同源性比较,

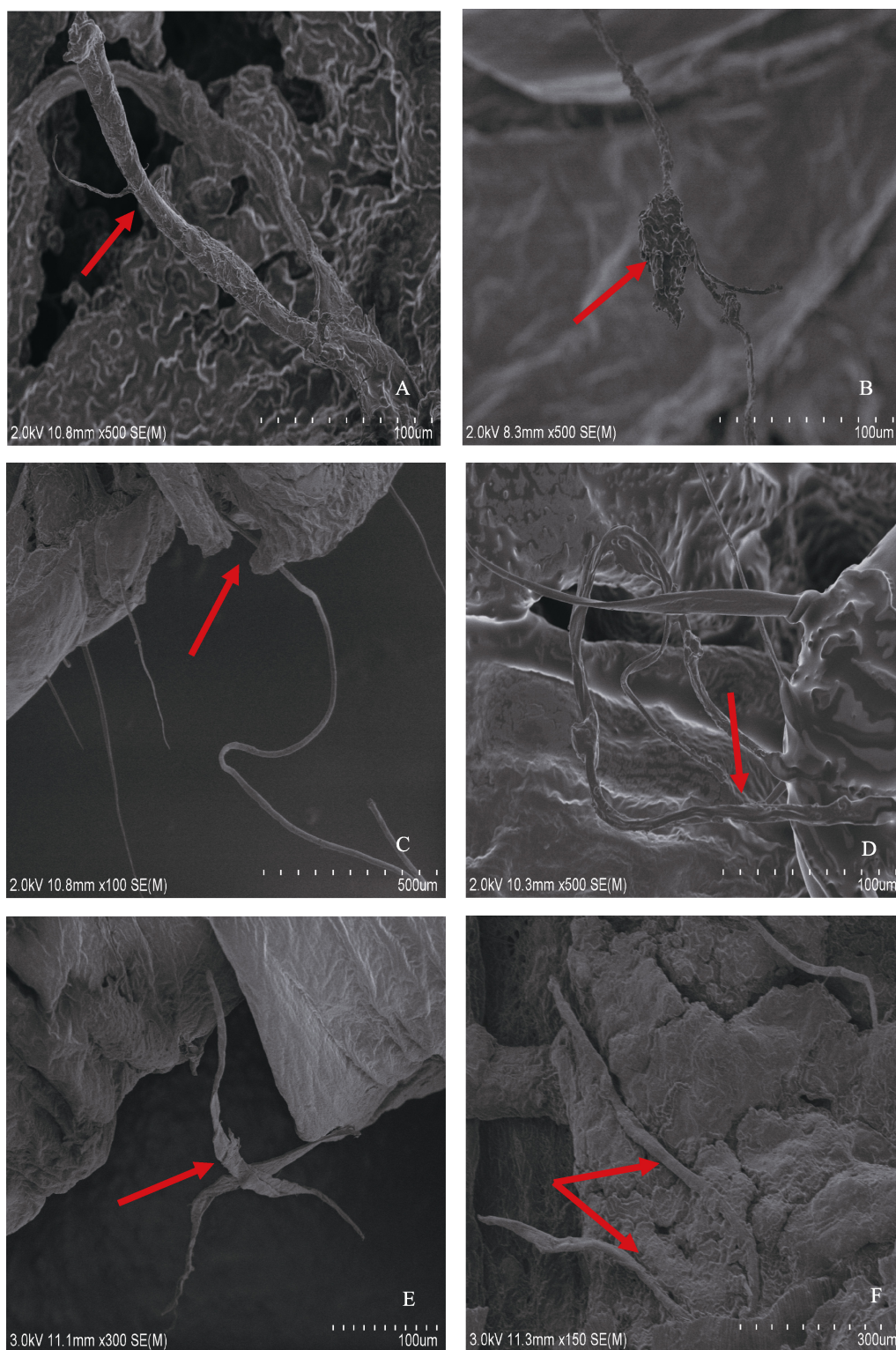


图 2 分生孢子在二化螟体表上的萌发及入侵部位

Fig. 2 Germination and invasion position of *Beauveria bassiana* conidia on the cuticle of *Chilo suppressalis*

得知该菌株与 NCBI 中注册的球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 菌株的同源性为 99%。通过

选用 40 余种不同真菌, 利用邻接法构建系统树, 如图 3 所示, 在系统树上可知, 所选用的不同白

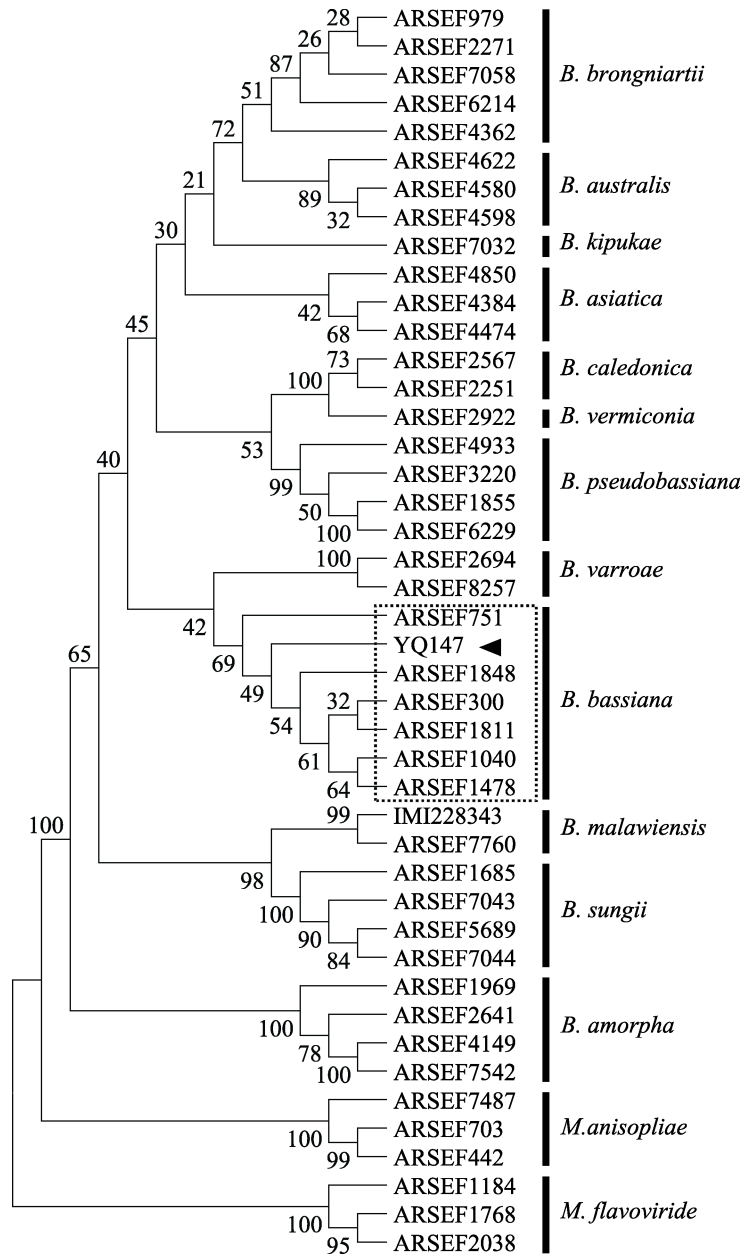


图 3 基于 18S rDNA 基因序列构建的真菌的进化树 (邻接法)

Fig. 3 The neighbor joining tree resulting from analysis of the 18S rDNA gene sequences of fungi

各菌株及 GenBank 登录号 The strains and their GenBank accession numbers: ARSEF1969: AY31998; ARSEF2641: AY532008; ARSEF4149: HQ880804; ARSEF7542: HQ880805; ARSEF4384: AY532026; ARSEF4474: AY532027; ARSEF4850: AY532028; ARSEF4580: HQ880788; ARSEF4598: HQ880789; ARSEF4622: HQ880790; ARSEF300: AY532015; ARSEF751: AY532045; ARSEF1040: AY531972; ARSEF1478: AY531981; ARSEF1811: AY531992; ARSEF1848: AY531995; ARSEF979: HQ880783; ARSEF2271: HQ880779; ARSEF4362: AY532025; ARSEF6214: HQ880774; ARSEF7058: HQ880773; ARSEF1567: AY531986; ARSEF2251: AY532003; ARSEF2567: AY532006; ARSEF7032: HQ880803; ARSEF7760: DQ376247; ARSEF1855: HQ880796; ARSEF3220: AY532020; ARSEF6229: HQ880799; ARSEF4933: AY532029; ARSEF1685: AY531990; ARSEF5689: AY532030; ARSEF7043: AY532039; ARSEF7044: AY532040; ARSEF2694: HQ880802; ARSEF8257: HQ880800; ARSEF2922: AY532012; ARSEF442: AF516300; ARSEF703: AF516301; ARSEF7487: HQ331446; ARSEF2038: FJ617319; ARSEF1184: AF138267; ARSEF1768: AF516291.

僵菌属和绿僵菌属被分在不同分支上, 所以该树形是可靠的, 而本文所筛选的菌株 YQ147 在树中与球孢白僵菌在同一分支上, 这与基因比对的结果一致, 因此推断该菌株为球孢白僵菌。

3 讨论

本文通过对杀虫真菌初步分离和筛选, 选择 10 种菌株对二化螟幼虫进行毒力测定, 从而挑选出高毒力菌株; 并对其菌落形态、菌落颜色和分生孢子大小等进行初步鉴定, 并在形态学研究的基础上, 通过分子鉴定和进化树归类, 更为可靠地明确了其种类。将实验所测得的菌株 YQ147 的 rDNA ITS 序列与 GenBank 中所注册的 AY531981、AY532045、AY531972、AY531992、AY532015 和 AY531995 6 个球孢白僵菌菌株的 18S rDNA ITS 序列进行同源性比较, 结果显示同源性为 99%, 而且该菌在进化树中与登记的球孢白僵菌在系统树的同一分支上, 这与基因比对的结果一致, 从而推断该菌为白僵菌属球孢白僵菌 *B. bassiana* (Bals.) Vuill, 为该菌的进一步研究与开发利用提供了基础。

本实验结果表明, 在同样实验条件下, 即相同孢子浓度 (1.0×10^8 孢子/mL)、相同温度湿度下, 所比较的 10 种杀虫真菌对二化螟幼虫均表现出一定的毒力, 不同菌株的侵染致病效果不同, 且不同菌株之间差异明显。其中, 菌株 YQ147 对二化螟幼虫的室内累计致死率为 10 个菌株中最高, 达 78.4%, LT_{50} 为 5.8 d, 菌株 QING 的累计死亡率为 74.5%, LT_{50} 为 6.3 d, 这 2 个菌株的累计校正死亡率差异不明显, 但菌株 YQ147 与菌株 Bbr14、Bbr84、WL324、PC31、Nr07、ANJ327、FY324 和 Pf10 相比差异显著。在 10 组处理中, 菌株 YQ147、QING、Bbr14、Bbr84 对二化螟幼虫的致病力均较强, LT_{50} 较低, 且该 4 种真菌都是白僵菌, 说明白僵菌对二化螟幼虫有较高的毒力, 而邓春生等 (2012) 利用球孢白僵菌 (孢子浓度为 1.0×10^7 孢子/mL) 防治马铃薯甲虫 LT_{50} 为 8 d, 大田处理 18 d 后死亡率达 98.87%, 其认为白僵菌对马铃薯甲虫有较高的防

治潜力。袁盛勇等 (2011) 利用球孢白僵菌防治亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 3 龄幼虫, 累计校正死亡率为 88.65%, LT_{50} 为 4.3 d, 对玉米螟有明显的毒力。袁盛勇等 (2010) 利用球孢白僵菌防治西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* 成虫时, LT_{50} 为 4.5 d, LC_{50} 为 4.0×10^6 孢子/mL, 说明球孢白僵菌对西花蓟马有较好的防治效果, 因此本实验所得的结论与其相符。而且对于利用白僵菌防治二化螟还鲜有报道, 这为白僵菌对二化螟的生物防治提供了一定的应用空间和思路。同时, 本文通过利用扫描电镜初步观察了真菌在二化螟虫体生长和萌发情况, 可以发现真菌的分生孢子与虫体建立的寄生关系, 并利用虫体营养条件萌发形成芽管和附着胞, 从而穿刺表皮进入虫体内部 (林华峰等, 1998; 李茂业等, 2011), 这与王龙江等 (2010) 研究球孢白僵菌对红火蚁 *Solenopsis invicta* 体表的入侵机理大致相同, 进一步证明了该菌株为白僵菌, 这为进一步研究白僵菌对二化螟的侵染能力和入侵机理提供了一定的理论依据。

参考文献 (References)

- Cao MZ, Shen J, Liu XY, Li M, 2001. The insecticide resistance in stripped stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker). *CRRN*, 9(1): 6–7.
- Clarkson JM, Charnley AK, 1996. New insights into mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends Microbiol. Lett.*, 133(4): 189–196.
- Coppling CP, Duke SO, 2007. Review: natural products that have been used commercially as crop protection agents. *Pest Manag. Sci.*, 63(1): 525–554.
- Han ZJ, Wang YC, 2003. Biochemical features of a resistant population of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker). *Acta Entomologica Sinica*, 46(2): 161–170.
- He YR, Lu LH, Kuang ZB, Feng X, Chen HY, Wu YJ, 2005. Effect of temperature and humidity on the virulence of beetle-derived *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycetes: Moniliales) against the daikon leaf beetle, *Phaedon brassicae* Baly (Coleoptera: Chrysomelidae). *Acta Entomologica Sinica*, 48(5): 679–686.

- Rehner SA, Minnis AM, Sung GH, Luangsa-ard JJ, Devotto L, Humber RA, 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 103(5): 1055–1073.
- Tang QY, Zhang CX, 2013. Data processing system (DPS) software with experimental design, statistical analysis and data mining developed for use in entomological research. *Insect Science*, 20(2): 254–260.
- Deng CS, Zhang YR, Zhang MM, Geng B, Wu W, Fu WJ, Zhang DM, 2012. Effect of *Beauveria bassiana* wettable powder against *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Chinese Journal of Biological Control*, 28(1): 62–66. [邓春生, 张燕荣, 张曼曼, 耿兵, 吴伟, 付文君, 张冬梅, 2012. 球孢白僵菌可湿性粉剂对马铃薯甲虫的防治效果. 中国生物防治学报, 28(1): 62–66.]
- Fang ZG, Zhang LQ, Zhao RY, 1999. Pathogenicity of 9 strains of *Beauveria Bassiana* to masson-pine caterpillar. *Journal of Zhejiang Forestry College*, 16 (4): 331–335. [方志刚, 张立钦, 赵仁友, 1999. 9 个白僵菌菌株对马尾松毛虫的致病性. 浙江林学院学报, 16(4): 331–335.]
- Fu ZJ, Chen JX, Fu LJ, 2000. A review of studies on the pathogenesis of *Beauveria bassiana* to insects. *Wuyi Science Journal*, 16(1): 105–109. [付志坚, 陈建新, 付丽君, 2000. 白僵菌对昆虫的致病机理研究综述. 武夷科学, 16(1): 105–109.]
- Huang FR, 2003. Studies on mixing *Beauveria bassiana*, the nuclear polyhedrosis virus, *Bacillus thuringiensis* and deetamethrin to control *Lymantria xylinea*. *Journal of Fujian Forestry Sci. and Tech.*, 27(3): 56–59. [黄芙蓉, 2003. 白僵菌与病毒、苏云金杆菌、溴氰菊酯混合防治木毒蛾的研究. 福建林业科技, 27(3): 56–59.]
- Huang SJ, Qin WJ, Liu H, 2009. Using 20% chlorantraniliprole sc to control rice stem borer (*Chilo suppressalis* Walker). *Acta Agriculturae Jiangxi*, 21(5): 87–89. [黄水金, 秦文婧, 刘辉, 2009. 20%氯虫苯甲酰胺 SC 防治水稻二化螟的应用研究. 江西农业学报, 21(5): 87–89.]
- Lei YY, Lv LH, Chen DH, 2010. Correlation between biological characteristics of *Beauveria bassiana* and its virulence to *Plutella xylostella*. *Chinese Journal of Biological Control*, 26(2): 143–148. [雷妍圆, 吕利华, 陈冬虹, 2010. 球孢白僵菌生物学特性与其对小菜蛾致病力相关性分析. 中国生物防治, 26(2): 143–148.]
- Li CX, Gu LQ, Zhang SH, Xia YM, 2007. Studies on the efficacy of *Beauveria bassiana* against on the *Plutella Xylostella*. *Journal of Tangshan Teachers College*, 29(2): 37–40. [李春香, 顾丽婧, 张淑红, 夏咏梅, 2007. 白僵菌对小菜蛾的杀伤效应研究. 唐山师范学院学报, 29(2): 37–40.]
- Li MY, Lin HF, Jin L, Zhang SY, 2011. Observations on infection of *Nilaparvata lugens* by *Metarhizium flavoviride* using a scanning electron microscope. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(5): 1412–1416. [李茂业, 林华峰, 金立, 张松影, 2011. 黄绿绿僵菌对褐飞虱侵染过程的扫描电镜观察. 应用昆虫学报, 48(5): 1412–1416.]
- Lin HF, Li MY, Zhang SY, Li SG, Zhang CQ, 2011. Molecular biological identification of entomogenous fungi isolated from the brown planthopper. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(5): 1401–1406. [林华峰, 李茂业, 张松影, 李世广, 张承后, 2011. 一种褐飞虱病原真菌的分子生物学鉴定. 应用昆虫学报, 48(5): 1401–1406.]
- Lin HF, Huang B, Li ZZ, Hu C, 1998. Electron microscopic scanning observation of the survival and infection of *Beauveria bassiana* on *dendrolimus punctatus*. *Mycosystema*, 17(4): 342–347. [林华峰, 黄勃, 李增智, 胡萃, 1998. 白僵菌在松毛虫体上宿存侵染的电镜扫描观察. 菌物系统, 17(4): 342–347.]
- Liu J, Chen HZ, Li ZH, 2003. Process development and future for entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* production. *Chinese Journal of Biological Control*, 19(2): 86–90. [刘健, 陈洪章, 李佐虎, 2003. 白僵菌杀虫剂生产工艺研究状况与展望. 中国生物防治, 19(2): 86–90.]
- Liu YQ, Feng MG, Liu SS, 2000. Effect of temperature on virulence of *Beauveria bassiana* against *myzus persicae*. *Chinese Journal of Biological Control*, 16(2): 56–60. [刘银泉, 冯明光, 刘树生, 2000. 不同温度下球孢白僵菌对桃蚜的毒力. 中国生物防治, 16(2): 56–60.]
- Luo HD, Yan JL, Yu Y, Tan WZ, 2012. Isolation, screening and identification of bacterial agents for biological control of colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). *Scientia Agricultura Sinica*, 45(18): 3744–3754. [罗华东, 严加林, 余洋, 谭万忠, 2012. 马铃薯甲虫的病原细菌分离及生防菌的筛选与鉴定. 中国农业科学, 45(18): 3744–3754.]
- Wang LJ, Lv LH, He YR, Xie MQ, 2010. Observation on infection process of *Beauveria bassiana* on cuticle of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae), using

- scanning electron microscope. *Acta Entomologica Sinica*, 53(1): 118–124.[王龙江, 吕利华, 何余容, 谢梅琼, 2010. 球孢白僵菌在红火蚁体表侵染的扫描电镜观察. *昆虫学报*, 53(1): 118–124.]
- Wei YB, Shi SH, Liu MX, 2005. Interactions between infestation regularity of *Chilo suppressalis* and cultivation factor. *Chinese Bulletin of Entomology*, 42(6): 700–704.[韦永保, 施守华, 刘明熙, 2005. 水稻二化螟灾变规律与栽培因素之关系分析. *昆虫知识*, 42(6): 700–704.]
- Xue J, Ge F, Li JW, 2005. The interrelation between *Chilo suppressalis* and crops and its influencing factors. *Chinese Bulletin of Entomology*, 42(3): 259–263.[薛进, 戈峰, 黎家文, 苏建伟, 2005. 二化螟与作物的相互关系及其影响因素. *昆虫知识*, 42(3): 259–263.]
- Yang MZ, Li XH, Tan YF, Tian ZL, 2005. Different material packaging three temperature storage of *Beauveria bassiana* powder on the research of the corn borer control effect. *Journal of Jilin Agricultural Sciences*, 30(2): 37–38.[杨敏芝, 李修海, 谭云峰, 田志来, 2005. 不同材质包装 3 种温度贮存白僵菌对玉米螟防治效果的研究. *吉林农业科学*, 30(2): 37–38.]
- Yao YJ, Xu XL, Zeng SG, Xu RZ, Xiong QH, Shu PP, 2013. Susceptibility of *Chilo suppressalis* to insecticides. *Plant Protection*, 39(6): 95–99.[姚英娟, 徐雪亮, 曾水根, 徐荣仔, 熊清华, 舒平平, 2013. 二化螟对不同药剂的敏感度研究. *植物保护*, 39(6): 95–99.]
- Yuan SY, Kong Q, Chen B, Xue CL, Tian XJ, Xiao C, Li ZY, 2011. Study on virulence of *Beauveria bassiana* MZ050724 to larvae of *Ostrinia furnacalis*. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 24(2): 608–611.[袁盛勇, 孔琼, 陈斌, 薛春丽, 田学军, 肖春, 李正跃, 2011. 球孢白僵菌 MZ050724 对亚洲玉米螟幼虫毒力研究. *西南农业学报*, 24(2): 608–611.]
- Yuan SY, Zhang HR, Kong Q, Li ZY, Luo DQ, Wang XL, Dong LL, 2010. Detection of pathogenicity of *Beauveria bassiana* MZ060812 against *Frankliniella occidentalis*. *Journal of Northwest A&F University(Nat. Sci. Ed.)*, 38(3): 145–149.[袁盛勇, 张宏瑞, 孔琼, 李正跃, 骆弟乾, 王学丽, 董丽玲, 2010. 球孢白僵菌 MZ060812 菌株对西花蓟马的致病性研究. *西北农林科技大学学报*, 38(3): 145–149.]