# 白僵菌菌株分离培养及对四种重要害虫的致病力*

庄宝龙** 赵 薇 裴海英 孙苓芙 王 煜 陈佳欢 于洪春***

（东北农业大学农学院，哈尔滨 150030）

**摘 要** 【**目的**】从田间自然感病致死的暗黑鳃金龟 *Holotrichia parallela* Motschulsky 幼虫虫体中获得一株虫生真菌，明确该菌株的种类、培养特性及其对 4 种重要农业害虫的致病力，以期获得高毒力生防菌株。【**方法**】采用培养基分离纯化培养菌株，在显微镜下进行形态鉴定，并观察菌落的生长特征，测定其生长速率、孢子产量和孢子萌发率；采用生物测定法，测定菌株对害虫的致病力。【**结果**】确定该菌株为球孢白僵菌，在 PDA 和 SDAY 培养基上的菌落特征存在形态差异；在 PDA 培养基上的生长速率显著高于 SDAY 上的，孢子萌发率则显著低于 SDAY 上的，但在 PDA 和 SDAY 上的产孢量差异不显著。球孢白僵菌对亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* Guenée 幼虫和二化螟 *Chilo suppressalis* Walker 幼虫的致病力最强，显著高于黄地老虎 *Agrotis segetum* Schiffermüller 和粘虫 *Mythimna separata* Walker 的；对同一种害虫 5 龄幼虫的致病力均大于 2 龄幼虫，其中，对黄地老虎和粘虫高龄幼虫的毒力显著高于低龄幼虫的。【**结论**】本研究获得一株球孢白僵菌，对重要的农业害虫二化螟、亚洲玉米螟、黄地老虎和粘虫幼虫均有致病性，但致病力存在显著差异；对高龄幼虫的致病力大于低龄幼虫。感染二化螟、亚洲玉米螟幼虫最大校正死亡率可达 94%以上，表明该菌株具有较大的应用潜能，适用于田间靶标害虫的生物防治。

**关键词** 白僵菌；菌株；分离培养；生物测定；致病力

# Isolation and culture of *Beauveria bassiana* and its pathogenicity to four important pests

ZHUANG Bao-Long** ZHAO Wei PEI Hai-Ying SUN Ling-Fu
WANG Yu CHEN Jia-Huan YU Hong-Chun***

(School of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract** **[Objectives]** A strain of entomogenous fungi was obtained from dead *Holotrichia parallela* Motschulsky larvae collected in the field, and its species and culture characteristics, as well as its virulence to four important agricultural pests, were measured and compared. **[Methods]** Fungal growth media were purified and cultured, and fungal morphology identified under a microscope. The colony growth characteristics of the fungal strain was observed, and its growth rate, spore yield and germination rate determined. The pathogenicity of the strain to the four pest species was determined by bioassay. **[Results]** The fungus was identified as *Beauveria bassiana*. Morphological differences in colony characteristics were apparent between fungal colonies cultured on PDA vs SDAY media. The growth rate on PDA was significantly higher than on SDAY, but the spore germination rate was significantly lower. The two media did not differ significantly in sporulation rate. The fungal strain was most pathogenic to *Ostrinia furnacalis* and *Chilo suppressalis* larvae, which were significantly more sucesptible to it than *Agrotis segetum* and *Mythimna separata*. The fungus was most virulent to 5th instar larvae of the same pest species than to 2nd instar larvae, and it was significantly more virulent to older instars of *Agrotis segetum* and *Mythimna*

*资助项目 Supported projects：黑龙江省应用技术研究与开发计划项目（GA19B104）

**第一作者 First author，E-mail：2295903202@qq.com

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

收稿日期 Received：2019-10-18；接受日期 Accepted：2020-03-10

*separata* than to younger instars. **[Conclusion]** *B. bassiana* is pathogenic to the larvae of important agricultural pests such as *Chilo suppressalis*, *Ostrinia furnacalis*, *Agrotis segetum* and *Mythimna separata*, but its pathogenicity varies between species and instars. Nonetheless, the maximum corrected mortality of *Chilo suppressalis* and *Ostrinia furnacalis* larvae after infection with this fungal strain was > 94%, which indicates that it has potential as a biological control for these pests.

**Key words** *Beauveriabassiana*; strain; isolation culture; bioassay; pathogenicity

白僵菌属于半知菌亚门、丝孢纲、丛梗孢目、丛梗孢科、白僵菌属 *Beauveria*，是最早发现的昆虫病原真菌，早在 1834 年，意大利学者 Bassi 首次发现家蚕可以感染白僵菌死亡（张小霞等，2010）。Vuillemin（1912）将其正式命名为白僵菌属。白僵菌是最常见和最重要的昆虫病原真菌之一，其在自然界分布广泛，侵染宿主种类众多，可侵染 15 个目、149 个科 700 余种昆虫和螨类（张小霞等，2010）。由于其具有生产成本低廉、防治效果较好，对人畜安全性高、害虫不易产生抗药性、具有再生性和兼容性等优点（刘聪鹤等，2016；于洪春等，2016），长期以来一直被用作生物防治害虫的重要手段，广泛用于农、林业害虫的生物防治（Zimmermann，2007；Duan *et al.*，2017）。目前国内外至少已有十余种白僵菌制剂注册商品化生产，并用于害虫防治（Faria and Wraight，2007；杨怀文等，2009）。同种白僵菌不同菌株具有不同的生化特性，对寄主昆虫的致病性也可以存在很大差异（蔡勇胜等，2006；孟祥坤等，2018）。因此，搜集、筛选和分离高致病力菌株是开展白僵菌生物防治的重要工作。白僵菌主要是从罹病致死的虫体分离获得，一些新的种或菌株陆续被发现（黄勃等，2007；李红霞等，2009）。本研究从田间罹病致死的暗黑鳃金龟幼虫体内分离培养获得一株白僵菌菌株，进行形态分类鉴定，研究其在不同培养基中的生长速率、产孢量及萌发率等生物学特性，并测定其对 4 种重要农业害虫二化螟 *Chilo suppressalis* Walker、粘虫 *Mythimna separata* Walker、亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* Guenée、黄地老虎 *Agrotis segetum* Schiffermüller 幼虫的致病性和致病力，评价该菌株的生物防治潜能，以期获得田间应用的高毒力菌株，为化学农药减量和绿色食品或有机食品生产提供高效的生防菌株资源。

# 1 材料与方法

## 1.1 实验材料

**1.1.1 供试虫源** 二化螟 *Chilo suppressalis* Walker 卵块由江西农业大学昆虫研究所提供，在室内孵化幼虫后，用新鲜的分蘖期稻秆饲养至所需要的虫龄，待用。

黄地老虎 *Agrotis segetum* Schiffermüller 的活蛹由中国农业科学院提供，在室内成虫羽化产卵后，收集孵化的幼虫，用灰菜饲养至所需要的虫龄，待用。

亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* Guenée 和粘虫 *Mythimna separata* Walker 成虫采自哈尔滨市郊区，经室内产卵孵化后，粘虫用新鲜幼嫩玉米叶饲养，亚洲玉米螟用人工饲料饲养，饲养至所需要虫龄，待用。

**1.1.2 供试菌株** 试验菌株来自于中国农业科学院廊坊中试基地花生田土壤中自然罹病的暗黑鳃金龟幼虫僵尸虫体提取。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 菌株分离纯化** 将暗黑鳃金龟幼虫僵虫虫体剪碎成小块，在超净工作台中用 75%酒精表面消毒 3-5 min，取出用无菌水清洗 5 次，然后接入 PDA 培养基（加入 0.1%青霉素）上。每个培养皿接尸块 3 块，三角形摆放。置于 26 ℃的霉菌培养箱培养 10 d 后，用接种环挑取边缘白色菌丝体划线纯化，等长出单菌落后转移到新 PDA 培养基上。重复操作 3 次得到纯化的菌株，于 4 ℃冰箱保存备用。

**1.2.2 菌株鉴定** 采用载片培养法，在灭菌的载玻片上放入长宽约 5 mm PDA 培养基的小方块，用接种针在培养基四周接种少量已纯化的真菌，盖上灭菌盖玻片放入大培养皿中保湿，于 26 ℃

培养 3 d 后，每天制片观察。制片时先取下盖玻片放在另一块干净的载玻片上，再移去培养基，盖上另一块盖玻片，在显微镜下观察菌丝、分生孢子梗、分生孢子等形态特征，并用 Motic Images Plus 2.0 软件进行拍照，根据菌落、菌丝、孢子、孢子梗等形态特征进行种类鉴定。

**1.2.3　孢子悬浮液配制**　取培养 15 d 左右的菌株在超净工作台内加入含 0.5‰吐温-80 的蒸馏水（即 2 000 倍吐温-80 稀释液）刮除菌落，洗出平皿内的孢子，转移到灭菌的三角瓶中，使用磁力搅拌器中速搅拌 20 min，使其均匀分散，配制成母液。采用 10 倍稀释法将母液稀释成 1 000 倍，显微镜下用血球计数板计数，5 板重复。将孢子悬浮液浓度稀释至 $1\times10^5$ cfu/mL、$1\times10^4$ cfu/mL 和 20-30 cfu/mL，备用。

**1.2.4　菌落形态特征及生长直径测量**　用移液枪移取浓度为 20-30 cfu/mL 的悬浮液 500 μL 置于 PDA、SDAY 平板中，匀速转动培养皿，使其均匀分布培养基表面，封口膜封边。5 次重复。将处理后的 PDA、SDAY 培养皿放入 26 ℃培养箱中培养，3 d 后开始每隔 48 h 用游标卡尺采用十字交叉法测量各菌落直径并记录，计算日均增长量，同时观察和记录不同培养基上的菌落颜色、基质颜色、菌落质地。菌落日均增长量（mm/d）= 末次测量值/培养天数。

**1.2.5　产孢量测定**　在超净工作台中移取 500 μL $1\times10^4$ cfu/mL 孢子液分别接种于直径 90 mm 并含有 PDA、SDAY 培养基的培养皿平板上，匀速转动培养皿，使菌液均匀分布培养基表面后，盖盖用封口膜封边。5 次重复。将 PDA、SDAY 培养皿放入 26 ℃培养箱中培养。15 d 后，向培养皿中加入 10 mL 0.5‰吐温-80 溶液，轻轻刮下整板菌落，并用移液器反复吹打，将菌液移入 100 mL 锥形瓶内，反复操作定容至 20 mL。将装有菌液的锥形瓶在震荡器上中速振荡 20 min。用血球计数板计数，求出平均每皿产孢量。

**1.2.6　孢子萌发率测定**　取 1 mL$1\times10^5$ cfu/mL 孢子液分别加入 10 mLPDA 和 SDAY 液体培养基中，在 26 ℃、220 r/min 条件下震荡培养 24 h，5 次重复。吸取适量菌液滴在载玻片上，置于显微镜下观察并记录孢子的萌发情况。芽管长度大于或等于孢子直径的孢子视为萌发，每处理单次镜检不少于 50 个孢子，重复镜检 5 次。孢子萌发百分率（%）=（视野中萌发孢子数/视野中孢子总数）× 100。

**1.2.7　菌株对 4 种重要农业害虫的生物测定**　按照 1.2.3 方法配制浓度为 $2.5\times10^9$、$2.5\times10^8$、$2.5\times10^7$、$2.5\times10^6$ 和 $2.5\times10^5$ cfu/mL 的孢子悬浮液备用。

将二化螟、粘虫、亚洲玉米螟、黄地老虎 2 龄和 5 龄幼虫分别放入含有吸水纸的养虫盒中，每盒放入幼虫 20-30 头。用微型喷雾器将上述浓度的孢子液喷施虫体表面，并设清水为对照。每个处理 3 次重复。处理后喂食饲料，每 24 h 更换 1 次新鲜饲料。将具有入土和土中化蛹习性的粘虫和黄地老虎高龄幼虫及时转入含有灭菌土壤的养虫盒中饲养。4 种幼虫处理后 3 d 开始每隔 48 h 调查 1 次，统计幼虫的活虫数和死虫数，计算害虫死亡率和校正死亡率。

### 1.3　数据处理分析

用 *T*-检验分析菌株在 2 种培养基中日均增长量、产孢量、萌发率及菌株对不同虫龄的校正死亡率的差异显著性。采用致死中浓度比率测定法（张鑫琳等，2014）分析菌株对不同害虫致病力的差异显著性，若两害虫致死中浓度（$LC_{50}$）的比率 95%置信区间包含 1，则二者之间毒力差异不显著，若不包含 1，则二者之间毒力差异显著。采用 DPS（V7.05）软件对菌株的生物测定数据进行分析处理，计算菌株对各害虫的毒力回归方程、致死中浓度（$LC_{50}$）和相关系数。

## 2　结果与分析

### 2.1　菌株鉴定

从暗黑鳃金龟幼虫僵尸中分离、纯化得到一株菌株，在显微镜下镜检可见：菌丝细长，有隔；分生孢子梗单生，呈瓶状；孢子梗的瓶体形状从基部显著膨大到细长瓶形不等。分生孢子生在“之”字形小梗上，绝大多数为圆球形，少数卵圆形，无色、单胞（图 1）。由此形态特征，初步鉴定为真菌门、半知菌亚门、丝孢纲、丝孢目、

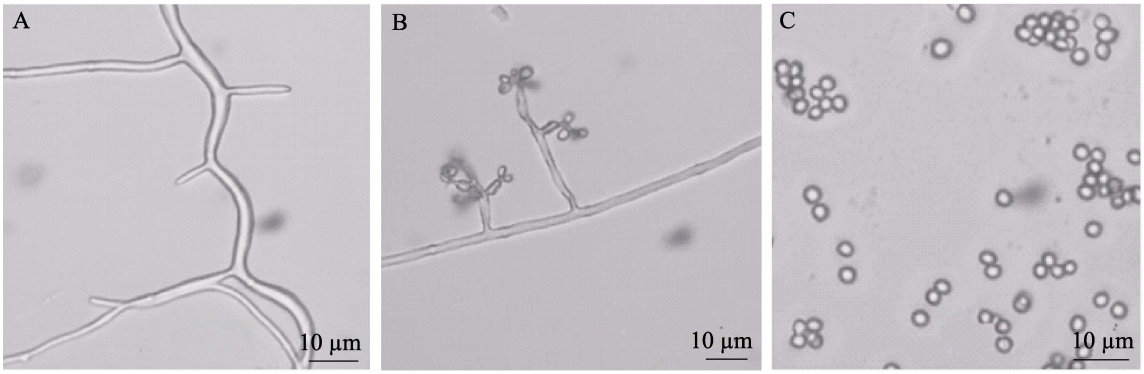


**图 1 菌株 Bb170428 形态**

**Fig. 1 Morphology of Bb170428 strain**

A. 菌株培养 3 d 的菌丝形态；B. 菌株培养 6 d 的菌丝、孢子梗、孢子形态；C. 菌株培养 10 d 的孢子形态。

A. Mycelial morphology of the strain cultured for 3 days; B. Mycelium, spore stalk, and spore morphology of the strain cultured for 6 days; C. Spore morphology of the strain cultured for 10 days.

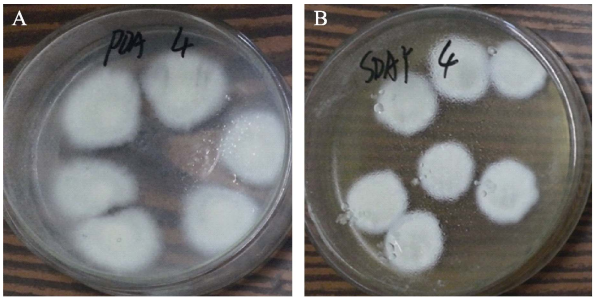


**图 2 白僵菌菌株 Bb170428 在不同培养基培养的菌落形态**

**Fig. 2 The photographs of *Beauveria bassiana* Bb170428 colonies on different mediume**

A. PDA 培养基培养 15 d 的菌落形态；

B. SDAY 培养基培养 15 d 的菌落形态。

A. The colony morphology cultured on PDA medium for 15 days; B The colony morphology cultured in SDAY medium for 15 days.

丛梗孢科、白僵菌属、球孢白僵菌，定名菌株为 Bb170428。

### 2.2 菌株 Bb170428 生物学特性

**2.2.1 菌落形态及生长速率** 菌株 Bb170428 在 PDA 和 SDAY 2 种培养基上生长的菌落颜色均为白色，基质色泽和菌落质地有所不同，其中 PDA 培养基上基质颜色呈浅黄色，菌落呈粉状，质地疏松，菌落较薄，边缘放射状；SDAY 培养基上基质颜色为黄褐色，菌落呈现致密绒毛状，菌落较厚，凹凸不平（图 2）。

菌落生长直径测量结果见表 1，菌株 Bb170428 在 2 种培养基上第 3 天长出菌落，第 5-11 天菌落生长较快，13 d 后菌落生长缓慢。PDA 培养基上的菌落直径显著大于 SDAY 培养基。在 PDA 培养基上的菌落日均增长量为 1.70 mm/d，SDAY 培养基上的日均增长量为 1.34 mm/d。*T*-检验结果表明，菌株 Bb170428 在两种培养基上的日均增长量差异极显著（$P<0.01$），在 PDA 培养基中的生长速率显著快于 SDAY 培养基（$P<0.05$）。

**2.2.2 产孢量及孢子萌发率** 菌株 Bb170428 在 PDA 和 SDAY 培养基上的产孢量及萌发率测定结果见表 2。在 PDA 培养基上的平均产孢量为 $8.65\times10^9$ 孢子/皿，在 SDAY 培养基上的平均产孢量为 $8.55\times10^9$ 孢子/皿，*T*-检验表明产孢量差异不显著（$P>0.05$）。在 SDAY 液态培养基中的孢子萌发率为 90.80%，大于在 PDA 液态培养基中的萌发率 87.02%，*T*-检验表明孢子萌发率差异显著（$P<0.05$）。

### 2.3 菌株 Bb170428 对 4 种害虫的致病性和致病力

**2.3.1 对 2 龄幼虫的毒力** 球孢白僵菌 Bb170428 对二化螟、亚洲玉米螟、黄地老虎和粘虫 2 龄幼虫的校正死亡率见表 3。该菌株对 4 种害虫 2 龄幼虫均具有致病性和致病力。处理后 3 d，亚洲玉米螟 2 龄幼虫在 5 种浓度处理下均出现死亡个体；二化螟 2 龄幼虫除浓度 $2.5\times10^5$ cfu/mL 外，其它各浓度处理均出现死亡个体；在浓度为

**表 1　菌落直径及生长速率**

**Table 1　Colony diameter and growth rate**

| 培养基 Medium | 菌落生长直径 Colony growth diameter (mm) | | | | | | | 日均增长量 Average daily growth (mm/d) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 3 d | 5 d | 7 d | 9 d | 11 d | 13 d | 15 d | |
| PDA | 3.23±0.46 | 4.13±0.45 | 7.56±0.54 | 13.21±0.55 | 20.09±0.93 | 24.16±1.05 | 25.52±0.99 | 1.70±0.07 |
| SDAY | 2.13±0.26 | 2.89±0.55 | 6.40±0.19 | 10.56±0.37 | 15.09±0.26 | 18.06±0.57 | 20.17±0.41 | 1.34±0.03 |
| *P* 值 *P* value | 0.022 7 | 0.039 4 | 0.025 2 | 0.002 4 | 0.000 8 | 0.000 9 | 0.001 0 | 0.001 0 |
| 显著性 Significant | * | * | * | ** | ** | ** | ** | ** |

表中数据为平均值±标准差。*表示在 0.05 水平差异显著；**表示在 0.01 水平差异显著。 PDA 培养基培养 15 d 的菌落形态；SDAY 培养基培养 15 d 的菌落形态。

Data in the table are mean±SD. * indicates significant difference at 0.05 level; ** indicates significant differences at 0.01 level.PDA：The colony morphology cultured on PDA medium for 15 days; SDAY：The colony morphology cultured in SDAY medium for 15 days.

**表 2　菌株 Bb170428 在两种培养基中的产孢量及萌发率**

**Table 2　Sporulation and germination rate of Bb170428 strain in two media**

| 培养基 Medium | 产孢量 Sporulation（×$10^9$ spores/dish） | | | | | 平均产孢量（×$10^9$ spores/dish） Average sporulation | 萌发率（%） Germination rate |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 重复 1 Repeat 1 | 重复 2 Repeat 2 | 重复 3 Repeat 3 | 重复 4 Repeat 4 | 重复 5 Repeat 5 | | |
| PDA | 8.62 | 8.59 | 8.75 | 8.74 | 8.55 | 8.65±0.09 | 87.02 |
| SDAY | 8.50 | 8.62 | 8.49 | 8.70 | 8.43 | 8.55±0.11 | 90.80 |
| *P* 值 *P* value | | | | | | 0.146 5 | 0.015 0 |
| 显著性 Significant | | | | | | – | * |

–代表差异不显著，*表示在 0.05 水平差异显著。表 4、表 6、表 7 同。

– indicates no significant difference, * indicates significant difference at 0.05 level. The same as table 4, table 6 and table 7.

**表 3　菌株 Bb170428 对 4 种害虫 2 龄幼虫的生物测定**

**Table 3　Bioassay of Bb170428 strain on 2nd instar larvae of 4 pests**

| 害虫 Pest | 浓度 Concentration (×$10^5$ cfu/mL) | 试虫数（头） Number | 累计校正死亡率（%） Cumulative adjusted mortality | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 3 d | 5 d | 7 d | 9 d | 11 d | 13 d | 15 d |
| 二化螟 *Chilo suppressalis* | 25 000 | 90 | 8.89 | 28.05 | 55.00 | 58.23 | 65.38 | 75.64 | 80.77 |
| | 2 500 | 90 | 6.67 | 15.85 | 41.25 | 44.30 | 56.41 | 66.67 | 78.21 |
| | 250 | 90 | 4.44 | 12.20 | 22.50 | 36.71 | 44.87 | 50.00 | 53.85 |
| | 25 | 90 | 3.33 | 10.98 | 20.00 | 27.85 | 37.18 | 42.31 | 43.59 |
| | 2.5 | 90 | 0.00 | 4.88 | 10.00 | 20.25 | 26.92 | 30.77 | 32.05 |
| 亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* | 25 000 | 75 | 10.67 | 26.67 | 34.78 | 46.27 | 60.61 | 72.73 | 81.82 |
| | 2 500 | 75 | 8.00 | 21.33 | 30.43 | 38.81 | 48.48 | 63.64 | 74.24 |
| | 250 | 75 | 8.00 | 14.67 | 26.09 | 31.34 | 45.45 | 53.03 | 57.58 |
| | 25 | 75 | 8.00 | 14.67 | 21.74 | 29.85 | 34.85 | 39.39 | 46.97 |
| | 2.5 | 75 | 2.67 | 8.80 | 17.39 | 23.88 | 28.79 | 34.85 | 39.39 |
| 黄地老虎 *Agrotis segetum* | 25 000 | 90 | 4.44 | 23.33 | 28.89 | 35.56 | 44.44 | 47.78 | 55.42 |
| | 2 500 | 90 | 3.33 | 13.33 | 17.78 | 23.33 | 26.67 | 32.94 | 42.17 |
| | 250 | 90 | 2.22 | 12.22 | 14.44 | 23.33 | 26.67 | 27.06 | 34.94 |
| | 25 | 90 | 0.00 | 10.00 | 13.33 | 18.89 | 21.11 | 22.35 | 27.71 |
| | 2.5 | 90 | 0.00 | 8.89 | 10.00 | 16.67 | 21.11 | 22.35 | 24.10 |
| 粘虫 *Mythimna separata* | 25 000 | 90 | 8.89 | 20.00 | 24.44 | 25.84 | 29.41 | 35.29 | 42.35 |
| | 2 500 | 90 | 3.33 | 11.11 | 14.44 | 17.98 | 18.82 | 25.88 | 37.64 |
| | 250 | 90 | 3.33 | 6.67 | 10.00 | 14.77 | 15.29 | 22.35 | 32.94 |
| | 25 | 90 | 0.00 | 3.33 | 6.67 | 8.99 | 9.41 | 16.47 | 30.59 |
| | 2.5 | 90 | 0.00 | 4.44 | 5.56 | 5.62 | 8.24 | 15.29 | 29.41 |

$2.5\times10^7$、$2.5\times10^8$ 和 $2.5\times10^9$ cfu/mL 的处理下，黄地老虎和粘虫 2 龄幼虫均出现死亡个体。随着侵染时间的延长，4 种害虫的校正死亡率均增加；随着处理菌株孢子浓度的增加，害虫校正死亡率也随之增高。菌株 Bb170428 对螟蛾科害虫亚洲玉米螟和二化螟 2 龄幼虫的致病力较高，对夜蛾科害虫黄地老虎和粘虫 2 龄幼虫的致病力较低，$2.5\times10^9$ cfu/mL 菌液处理后 15 d 累计校正死亡率分别达到 81.82%、80.77%、55.42%和 42.35%。

根据菌株 Bb170428 侵染后各害虫校正死亡率与浓度对数的关系，求得 Bb170428 对二化螟、亚洲玉米螟、黄地老虎和粘虫 2 龄幼虫的毒力回归方程分别为 $y$=2.551 3+0.361 2$x$（$r$=0.977 3）、$y$=3.000 9+0.308 2 $x$（$r$=0.9903）、$y$=3.118 1+0.207 3 $x$（$r$=0.983 6）和 $y$=3.942 1+0.089 0 $x$（$r$=0.974 1）；对 4 种害虫的致死中浓度 $LC_{50}$ 分别为 $6.01\times10^6$、$3.06\times10^6$、$1.20\times10^9$ 和 $7.75\times10^{11}$ cfu/mL。其对 4 种害虫 2 龄幼虫的毒力大小为：亚洲玉米螟>二化螟>黄地老虎>粘虫。采用致死中浓度比率测定法比较菌株对 2 种害虫致病力差异，毒力比较结果见表 4。菌株 Bb170428 对 4 种害虫 2 龄幼虫的毒力存在差异，其中，二化螟和亚洲玉米螟的毒力差异不显著（$P$>0.05），而与黄地老虎、粘虫的毒力均存在显著差异（$P$<0.05），黄地老虎与粘虫的毒力也存在显著差异（$P$<0.05）。菌株 Bb170428 对二化螟和亚洲玉米螟 2 龄幼虫的毒力最高，显著高于黄地老虎和粘虫，而对黄地老虎的毒力显著高于粘虫。

**表 4　菌株 Bb170428 对 4 种害虫 2 龄幼虫的毒力比较**

**Table 4　Comparison of the virulence of Bb170428 strain on 2nd instar larvae of 4 pests**

| 比较组别 Comparison group | 比 Ratio | 95%置信区间 95% confidence intervals | 显著性 Significant |
|---|---|---|---|
| 二化螟：亚洲玉米螟 *Chilo suppressalis*：*Ostrinia furnacalis* | 1.964 8 | 0.674 4-5.724 1 | – |
| 二化螟：黄地老虎 *Chilo suppressalis*：*Agrotis segetum* | 0.006 7 | 0.002 6-0.028 0 | * |
| 二化螟：粘虫 *Chilo suppressalis*：*Mythimna separata* | 0.000 0 | 0.000 0-0.000 2 | * |
| 亚洲玉米螟：黄地老虎 *Ostrinia furnacalis*：*Agrotis segetum* | 0.003 4 | 0.000 9-0.012 4 | * |
| 亚洲玉米螟：粘虫 *Ostrinia furnacalis*：*Mythimna separata* | 0.000 0 | 0.000 0-0.000 1 | * |
| 黄地老虎：粘虫 *Agrotis segetum*：*Mythimna separata* | 0.001 2 | 0.000 1-0.024 7 | * |

**2.3.2　对 5 龄幼虫的毒力**　菌株 Bb170428 感染二化螟、亚洲玉米螟、黄地老虎和粘虫 5 龄幼虫的校正死亡率见表 5，表明菌株 Bb170428 对 4 种害虫 5 龄幼虫均具有致病性和致病力。处理后 3 d 开始，除 $2.5\times10^5$ cfu/mL 以外其它菌剂浓度处理的二化螟、亚洲玉米螟、黄地老虎 5 龄幼虫均出现死亡个体，$2.5\times10^7$、$2.5\times10^8$、$2.5\times10^9$ cfu/mL 处理的粘虫 5 龄幼虫也有死亡个体出现。随着处理时间的延长，各害虫校正死亡率逐渐增加，并随处理菌株孢子浓度的增加，各害虫校正死亡率也随之增大。$2.5\times10^9$ cfu/mL 菌液处理后 15 d，二化螟、亚洲玉米螟、黄地老虎及粘虫高龄幼虫和蛹的累计校正死亡率分别达到 94.55%、94.64%、80.00%和 54.76%。感染菌株 Bb170428 的亚洲玉米螟和二化螟 5 龄幼虫的致死率最高，其次为黄地老虎 5 龄幼虫，而粘虫 5 龄幼虫的致死率最低。

菌株 Bb170428 感染二化螟、亚洲玉米螟、黄地老虎及粘虫 5 龄幼虫第 15 天的毒力回归方程分别为：$y$=2.293 7+0.443 8$x$（$r$=0.979 2）、$y$=2.150 5+0.468 7$x$（$r$=0.986 3）、$y$=2.842 7+0.313 2$x$（$r$=0.993 2）、$y$=3.864 8+0.120 5$x$（$r$=0.961 0）；致死中浓度 $LC_{50}$ 分别为：$1.25\times10^6$、$1.20\times10^6$、$7.72\times10^6$、$2.63\times10^9$ cfu/mL。其对 4 种害虫 5 龄幼虫的毒力大小为：亚洲玉米螟>二化螟>黄地老虎>粘虫。采用致死中浓度比率测定法比较其对各害虫的毒力差异，结果见表 6。菌株 Bb170428 除感染二化螟和亚洲玉米螟 5 龄幼虫的毒力差异不显著以外（$P$>0.05），与感染其它害虫毒力均存在显著差异（$P$<0.05），即菌株 Bb170428 对二化螟和亚洲玉米螟 5 龄幼虫的毒力最高，显著高于黄地老虎和粘虫 5 龄幼虫，而对黄地老虎

**表 5　菌株 Bb170428 对 4 种害虫 5 龄幼虫的生物测定**

**Table 5　Bioassay of Bb170428 strain on 5th instar larvae of 4 pests**

| 害虫 Pest | 浓度 Concentration（$\times10^5$ cfu/mL） | 试虫数（头）Number | 累计校正死亡率（%）Cumulative adjusted mortality | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 3 d | 5 d | 7 d | 9 d | 11 d | 13 d | 15 d |
| 二化螟 *Chilo suppressalis* | 25 000 | 60 | 10.00 | 28.33 | 49.12 | 67.27 | 83.64 | 94.55 | 94.55 |
| | 2 500 | 60 | 6.67 | 16.67 | 35.09 | 52.73 | 63.64 | 80.00 | 83.64 |
| | 250 | 60 | 5.00 | 13.33 | 29.82 | 43.64 | 50.91 | 61.82 | 63.64 |
| | 25 | 60 | 3.33 | 11.67 | 22.81 | 34.55 | 43.64 | 54.55 | 56.36 |
| | 2.5 | 60 | 0.00 | 6.67 | 12.28 | 27.27 | 38.18 | 41.82 | 41.82 |
| 亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* | 25 000 | 60 | 11.67 | 26.67 | 43.33 | 53.45 | 70.18 | 87.50 | 94.64 |
| | 2 500 | 60 | 8.33 | 18.33 | 25.00 | 37.93 | 61.40 | 78.57 | 87.50 |
| | 250 | 60 | 5.00 | 16.67 | 21.67 | 27.59 | 42.11 | 57.14 | 67.86 |
| | 25 | 60 | 5.00 | 13.33 | 20.00 | 27.59 | 40.35 | 46.43 | 51.79 |
| | 2.5 | 60 | 0.00 | 8.33 | 16.67 | 24.14 | 33.33 | 37.50 | 42.86 |
| 黄地老虎 *Agrotis segetum* | 25 000 | 60 | 10.00 | 20.00 | 25.00 | 35.09 | 42.86 | 57.14 | 80.00 |
| | 2 500 | 60 | 5.00 | 11.76 | 20.00 | 26.32 | 28.57 | 44.64 | 67.27 |
| | 250 | 60 | 5.00 | 8.33 | 13.33 | 19.30 | 23.21 | 32.14 | 54.55 |
| | 25 | 60 | 1.67 | 8.33 | 10.00 | 12.28 | 14.29 | 30.36 | 41.82 |
| | 2.5 | 60 | 0.00 | 5.00 | 8.33 | 10.53 | 12.50 | 33.93 | 34.55 |
| 粘虫 *Mythimna separata* | 25 000 | 90 | 2.22 | 4.76 | 16.67 | 28.57 | 40.48 | 54.76 | 54.76 |
| | 2 500 | 90 | 2.22 | 4.76 | 10.71 | 25.00 | 39.29 | 44.05 | 48.81 |
| | 250 | 90 | 1.11 | 3.57 | 8.33 | 11.90 | 23.81 | 29.76 | 42.86 |
| | 25 | 90 | 0.00 | 0.00 | 7.14 | 11.90 | 17.86 | 27.38 | 38.10 |
| | 2.5 | 90 | 0.00 | 0.00 | 4.76 | 10.71 | 13.10 | 20.24 | 32.14 |

**表 6　菌株 Bb170428 对 4 种害虫 5 龄幼虫的毒力比较**

**Table 6　Comparison of the virulence of Bb170428 strain on 5th instar larvae of 4 pests**

| 比较组别 Comparison group | 比 Ratio | 95%置信区间 95% confidence intervals | 显著性 Significant |
|---|---|---|---|
| 二化螟：亚洲玉米螟 *Chilo suppressalis*：*Ostrinia furnacalis* | 1.043 3 | 0.274 7-3.962 6 | – |
| 二化螟：黄地老虎 *Chilo suppressalis*：*Agrotis segetum* | 0.162 3 | 0.052 3-0.503 7 | * |
| 二化螟：粘虫 *Chilo suppressalis*：*Mythimna separata* | 0.003 2 | 0.001 1-0.009 2 | * |
| 亚洲玉米螟：黄地老虎 *Ostriniafurnacalis*：*Agrotis segetum* | 0.155 6 | 0.059 7-0.405 4 | * |
| 亚洲玉米螟：粘虫 *Ostrinia furnacalis*：*Mythimna separata* | 0.003 1 | 0.001 3-0.007 3 | * |
| 黄地老虎：粘虫 *Agrotis segetum*：*Mythimna separata* | 0.019 9 | 0.012 2-0.032 5 | * |

5 龄幼虫的毒力显著高于粘虫 5 龄幼虫。

**2.3.3　对同种害虫不同虫龄幼虫的毒力比较**　不同浓度菌株 Bb170428 感染二化螟、亚洲玉米螟、黄地老虎、粘虫 2 龄和 5 龄幼虫后第 15 天的校正死亡率见图 3。4 种害虫的 2 龄和 5 龄幼虫的校正死亡率随孢子浓度的增加均增大，其中二化螟和亚洲玉米螟不同虫龄的最高校正死亡率均达到 80%以上。在同一孢子浓度下，Bb170428 感染二化螟、亚洲玉米螟、黄地老虎、粘虫 5 龄幼虫的校正死亡率均大于 2 龄幼虫，表明该菌株对 5 龄幼虫的致病力强于 2 龄幼虫。采用致死中浓度比率测定法比较菌株 Bb170428 对同一种害虫不同虫龄幼虫的毒力差异，结果见表 7。Bb170428 对亚洲玉米螟、二化螟 2 龄和 5 龄幼虫的毒力差异不显著（$P$>0.05），但对黄地老虎、粘虫 2 龄幼虫和 5 龄幼虫毒力显著差异（$P$<0.05），表明该菌株对黄地老虎、粘虫高龄幼虫的致病力显著高于低龄幼虫。

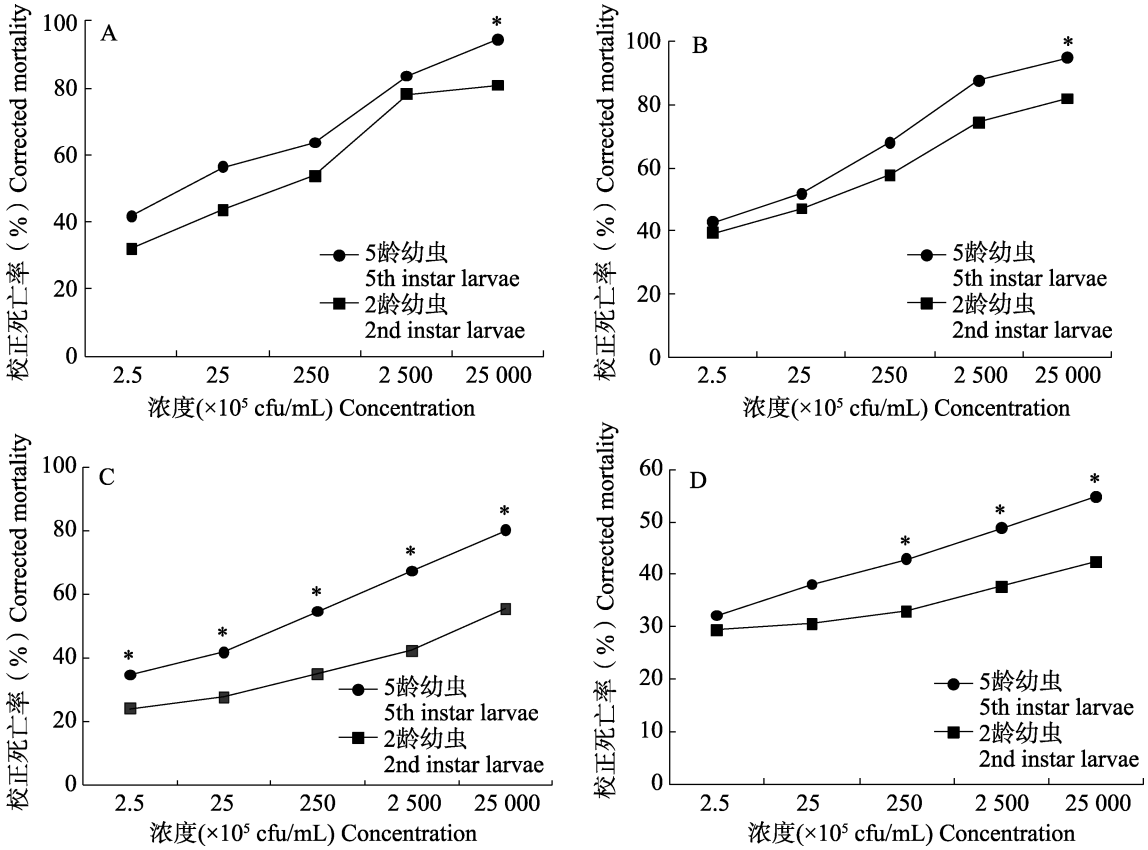


**图 3　菌株 Bb170428 感染 4 种害虫 2 龄和 5 龄幼虫 15 d 后的校正死亡率**

**Fig. 3　Corrected mortality after 15 d of infection by Bb170428 strain on 2nd and 5th instar larvae of 4 pests**

A. 二化螟；B. 亚洲玉米螟；C. 黄地老虎；D. 粘虫。

A. *Chilo suppressalis*; B. *Ostrinia furnacalis*; C. *Agrotis segetum*; D. *Mythimna separate*.

图上标有*表示差异显著。Data with * indicate significant different.

**表 7　菌株 Bb170428 对 4 种害虫不同虫龄的毒力比较**

**Table 7　Comparison of the virulence of Bb170428 strain on different instar larvae of 4 pests**

| 比较组别<br>Comparison group | 比<br>Ratio | 95%置信区间<br>95% confidence intervals | 显著性<br>Significant |
|---|---|---|---|
| 二化螟 2 龄幼虫：5 龄幼虫<br>*Chilo suppressalis* 2nd instar larvae：5th instar larvae | 4.799 6 | 0.991 8-18.598 9 | – |
| 亚洲玉米螟 2 龄幼虫：5 龄幼虫<br>*Ostrinia furnacalis* 2nd instar larvae：5th instar larvae | 2.550 5 | 0.899 0-7.235 9 | – |
| 黄地老虎 2 龄幼虫：5 龄幼虫<br>*Agrotis segetum* 2nd instar larvae：5th instar larvae | $1.56\times10^{2}$ | 49.495 8-489.278 5 | * |
| 粘虫 2 龄幼虫：5 龄幼虫<br>*Mythimna separate* 2nd instar larvae：5th instar larvae | $2.01\times10^{3}$ | $1.16\times10^{2}$-$3.49\times10^{4}$ | * |

## 3　讨论

本研究从暗黑鳃金龟幼虫体内分离、纯化一株虫生真菌，根据其在培养基上菌落颜色、质地，菌丝及孢子、孢子梗、产孢结构等形态指标鉴定其所属种为球孢白僵菌。由于白僵菌寄主种类繁多，其形态特征多样化，因此白僵菌属中种的鉴定应以形态学特征为主，同时应兼顾一些生理生

化特征。近年来，ITS 序列等分子序列的信息已被应用到白僵菌的分类中（陈立杰等，2008；蔡三山等，2016），通过形态学特征结合 ITS 序列等分子特征对白僵菌种的鉴定会更加准确。

菌株 Bb170428 在不同培养基的生长特性存在差异。在 PDA 培养基中的生长速度明显快于 SDAY 培养基，可能与 2 种培养基中营养成分的不同有关，PDA 培养基中的马铃薯含有碳源、维生素、氮源、微量元素、无机盐等营养成分（黄强等，2018），能为白僵菌生长提供更全面的营养物质。在 SDAY 培养基中的萌发率显著高于 PDA 培养基，其主要原因 SDAY 培养基中含有蛋白胨，而蛋白胨含有丰富的氮源是孢子萌发的主要因素，有学者认为蛋白胨是白僵菌孢子萌发的最佳氮源（胡强等，2008）。菌株 Bb170428 在 PDA 和 SDAY 2 种培养基上的产孢量并无明显差异。一方面原因是在 PDA 培养基中的生长速度快，在 SDAY 培养基中的萌发率高，两者相抵；另一方面，2 种培养基中都含有葡萄糖，以葡萄糖为主要碳源培养基上白僵菌的产孢量较高（徐忠宝等，2011），最终导致在 2 种培养基中的产孢量变化不大。

本研究比较了菌株 Bb170428 对同一害虫 2 龄幼虫和 5 龄幼虫的致病力，结果表明同一害虫中对 5 龄幼虫的毒力均大于 2 龄幼虫，但二化螟、亚洲玉米螟 5 龄和 2 龄幼虫的毒力差异不显著，对黄地老虎、粘虫 5 龄幼虫的毒力显著大于 2 龄幼虫。这可能与虫体所处的环境湿度和紫外线辐射强度等有关，二化螟和亚洲玉米螟为钻蛀性害虫，长期处于食料内部，湿度较大，紫外线辐射强度低；黄地老虎和粘虫低龄幼虫在叶面取食，暴露于空气中，湿度较低，紫外线辐射强度较大，而高龄幼虫钻入土壤中，湿度较大，有利于白僵菌孢子萌发和侵染。因此，白僵菌更适合在土壤和植物组织中等隐蔽场所生活和栖居害虫的防治。

白僵菌虽为广谱性昆虫病原真菌，但不同菌株对寄主昆虫表现出一定专化性，造成其对害虫致病力出现差异，不同来源的白僵菌对不同昆虫以及同一来源白僵菌对不同昆虫的毒力不同（Wraight *et al.*，2010；张龙娃等，2016）。二化螟、亚洲玉米螟、黄地老虎和粘虫是我国农业生产上的重大害虫，本文证实菌株 Bb170428 对这 4 种害虫均有致病性，但不同害虫间致病力存在明显差异。本论文分离出的菌株 Bb170428 对二化螟、亚洲玉米螟低龄和高龄幼虫的毒力均较高，最大校正死亡率可达 94%以上，表明该菌株对二化螟、亚洲玉米螟具有较好的生物防治应用潜能，可作为生防菌株资源，适用于田间靶标害虫的生物防治，这对靶标害虫的绿色防控和减少化学农药的使用量具有积极现实意义。

## 参考文献 (References)


Cai SS, Ouyang J, Wang YX, Cha YP, Hong CH, Chen JY, 2016. Internal transcribed spacer region sequencing and phylogenetic analysis of 10 strains of *Beauveria* spp. *Journal of Northwest Forestry University*, 31(5): 182–187. [蔡三山, 欧阳静, 王义勋, 查玉平, 洪承昊, 陈京元, 2016. 10 株白僵菌菌株 ITS 序列测定和系统发育分析. 西北林学院学报, 31(5): 182–187.]

Cai YS, Yang PX, Hong DH, 2006. Comparison of characteristics of native strains of *Beauveria bassiana*. *Plant Protection Transactions*, 48(2): 117–128. [蔡勇胜, 杨芃菰, 洪德惠, 2006. 本土白僵菌(*Beauveria bassiana*)菌株之特性差异比较. 植保会刊, 48(2): 117–128.]

Chen LJ, Liu B, Zheng Y, Duan YX, Chen JS, 2008. Separation and Identification of 154 Strains *Beauveria*. *Hubei Agricultural Sciences*, 47(12): 1436–1438. [陈立杰, 刘彬, 郑莹, 段玉玺, 陈井生, 2008. 白僵菌的分离鉴定及 ITS 序列分析. 湖北农业科学, 47(12): 1436–1438.]

Duan YL, Wu H, Ma ZY, Yang L, Ma DY, 2017. Scanning electron microscopy and histopathological observations of, *Beauveria bassiana*, infection of Colorado potato beetle larvae. *Microbial Pathogenesis*, 111(10): 435–439.

Faria MR, Wraight SP, 2007. Mycoinsectides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43(3): 237–256.

Huang B, Chen MJ, Wang SB, Li ZZ, Fan MZ, 2007. A new record of *Beauveria* isolated from Scolytidae in China. *Mycosystema*, 26(1): 139–142. [黄勃, 陈名君, 王四宝, 李增智, 樊美珍, 2007. 分离自小蠹虫的白僵菌属一中国新记录种. 菌物学报, 26(1): 139–142.]

Huang Q, Shu T, Liu XL, Ou YM, Zheng M, 2018. Overview of the nutritional value of potato. *Modern Food*, (16)：58–59. [黄强, 舒

婷, 刘小龙, 欧阳满, 郑敏, 2018. 马铃薯的营养价值概述. 现代食品, (16): 58–59.]

Hu Q, Bei NX, Gao P, Wang P, 2008. Biological char acteristics of strain Bb2 and its virulence against wheat aphids. *Hubei Agricultural Sciences*, 4(4): 430–432. [胡强, 贝纳新, 高萍, 王彭, 2008. 白僵菌 Bb2 菌株生物学特性及对小麦蚜虫的毒力测定. 湖北农业科学, 4(4): 430–432.]

Liu CH, Wang YW, Yu HC, Sun YF, Hou YM, Zhao KJ, Li KB, 2016. Toxicity of *Beauveria brongniartii* to two cutworm species. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 53(4): 739–744. [刘聪鹤, 王雨薇, 于洪春, 孙艺峰, 侯月敏, 赵奎军, 李克斌, 2016. 卵孢白僵菌及添加杀虫助剂对两种地老虎的生物活性测定. 应用昆虫学报, 53(4): 739–744.]

Li HX, Yu HC, Xi XJ, 2009. Isolation and identification of a strain of *Beauveria* sp. and its biologicalactivity to *Colaphellus bowringi*. *Chinese Bulletin of Entomology*, 46(5): 744–748. [李红霞, 于洪春, 席贤举, 2009. 一株白僵菌菌株的分离鉴定及对大猿叶虫的生物活性测定. 昆虫知识, 46(5): 744–748.]

Meng XK, Zhu C, Yu X, Liu YJ, Hu ZP, Fan LC, 2018. Screening of highly pathogenic *Beauveria bassiana* strain and its virulence against peanut beet armyworm. *Chinese Journal of Biological Control*, 34(2): 259–265. [孟祥坤, 朱超, 于新, 刘元军, 胡兆平, 范玲超, 2018. 高毒力白僵菌的筛选及对花生甜菜夜蛾的致病力. 中国生物防治学报, 34(2): 259–265.]

Vuillemin P, 1912. *Beauveria* nouveau genre de verticillacees. *Bull. Soc. Bot. Franc.*, 59(1): 34–40.

Wraight SP, Ramos ME, Avery PB, Jaronski ST, Vandenberg JD, 2010. Comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates against lepidopteran pests of vegetable crops. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(3): 186–199.

Xu ZB, Liu AP, Wu JH, Huang HG, Xu LB, Gao SJ, Qiao YR, 2011. Effects of nutritional conditions on growth of *Beauveria bassiana*. *Pratacultural Science*, 28(6): 1149–1155. [徐忠宝, 刘爱萍, 吴晋华, 黄海广, 徐林波, 高书晶, 乔艳荣, 2011. 不同营养条件对草地螟球孢白僵菌生长的影响. 草业科学, 28(6): 1149–1155.]

Yang HW, Wu JW, Chen JF, 2009. Biological Control Innovation and Practice. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press. 397–398. [杨怀文, 吴钜文, 陈建锋, 2009. 生物防治创新与实践. 北京: 中国农业科学技术出版社. 397–398. ]

Yu HC, Du J, Song LT, Sun YF, Liu CH, Zhao KJ, Li KB, Xu GQ, 2016. Effect of ten insecticides on conidial germination and colonies growth of *Beauveria brongniartii*. *Chinese Journal of Biological Control*, 32(4): 449–455. [于洪春, 杜娟, 宋龙腾, 孙艺峰, 刘聪鹤, 赵奎军, 李克斌, 许国庆, 2016. 十种杀虫剂对布氏白僵菌孢子萌发和菌落生长的影响. 中国生物防治学报, 32(4): 449–455.]

Zhang LW, Kang K, Liu YJ, Zhang J, Sun L, Zhan C, Huang CC, Jiang LY, Ye KY, Ding DG, 2016. Evaluation of *Beauveria bassiana* isolates as potential agents for control of *Hyphan triacunea* (Lepidoptera: Arctiidae). *Acta Entomologica Sinica*, 59(1): 111–118. [张龙娃, 康克, 刘玉军, 张晶, 孙龙, 詹成, 黄长春, 蒋丽雅, 叶开云, 丁德贵, 2016. 美国白蛾高毒力球孢白僵菌菌株筛选. 昆虫学报, 59(1): 111–118. ]

Zhang XL, Yu HC, Fang DD, Xiang DD, Xu ZN, Xu GQ, 2014. The screening of high virulence *Bacillus thuringiensis* Strains to *Chilo suppressalis* (Walker). *Northern Horticulture*, (16): 112–114. [张鑫琳, 于洪春, 房丹丹, 项丹丹, 许振南, 许国庆, 2014. 二化螟高毒力苏云金杆菌菌株的筛选. 北方园艺, (16): 112–114.]

Zhang XX, Yin XM, Liang ZP, 2010. Basic and Application of Pest Biological Control Technology. Beijing: Science Press. 162–163. [张小霞, 尹新明, 梁振普, 2010. 害虫生物防治技术基础与应用. 北京: 科学出版社. 162–163.]

Zimmermann G, 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(5): 553–596.