

研究报告

球孢白僵菌的分离鉴定及其对蒙古拟地甲的毒力分析

郑妮莎^{#1}, 邓全^{#2}, 石文¹, 高宇¹, 李响¹, 刘东阳², 刘苏^{*1}, 李茂业^{*1}

1 安徽农业大学 植物保护学院 农产品质量与生物安全教育部重点实验室, 安徽 合肥 230036

2 四川省烟草公司凉山州公司, 四川 西昌 615000

郑妮莎, 邓全, 石文, 高宇, 李响, 刘东阳, 刘苏, 李茂业. 球孢白僵菌的分离鉴定及其对蒙古拟地甲的毒力分析[J]. 微生物学通报, 2025, 52(6): 2588-2598.

ZHENG Nisha, DENG Quan, SHI Wen, GAO Yu, LI Xiang, LIU Dongyang, LIU Su, LI Maoye. Isolation and identification of *Beauveria bassiana* strains and test of their virulence to *Gonocephalum mongolicum*[J]. Microbiology China, 2025, 52(6): 2588-2598.

摘要:【背景】昆虫病原真菌是自然界昆虫种群消长的重要调节因子,但目前对蒙古拟地甲(*Gonocephalum mongolicum*)高毒力菌株的研究非常缺乏。【目的】分离鉴定昆虫病原真菌,探究昆虫病原真菌对蒙古拟地甲成虫的毒力,为蒙古拟地甲的绿色防控提供新思路。【方法】从自然染菌的蒙古拟地甲僵虫上分离昆虫病原真菌,使用形态学特征和分子生物学技术鉴定真菌种属,采用浸虫法测定蒙古拟地甲成虫的校正死亡率和致死中时间(LT_{50})。【结果】3株真菌均为球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*),编号为Bb23、Bb24和Bb25。室内试验发现3株球孢白僵菌对蒙古拟地甲成虫的毒力存在差异,在 1.0×10^8 CFU/mL剂量下接种后20 d,菌株Bb24处理组试虫校正死亡率为87.88%, LT_{50} 为6.74 d;而菌株Bb23和Bb25处理组试虫校正死亡率分别为42.42%和33.34%。【结论】本研究获得了3株球孢白僵菌,其中菌株Bb24对蒙古拟地甲成虫具有高毒力,具有进一步开发利用的潜力。

关键词: 球孢白僵菌; 蒙古拟地甲; 鉴定; 毒力测定; 生物防治

资助项目: 安徽省高校自然科学基金项目(2023AH051053); 中国烟草总公司四川省公司科技专项项目(SCYC202410, SCYC202417, SCYC202112); 烟草行业青年科技托举人才项目(YCQTSC202401); 烟草行业烟草病虫害监测与综合治理重点实验室开放课题(KLTPIIMT2023-09)

This work was supported by the Natural Science Research Project of Universities in Anhui Province (2023AH051053), the Key Project of Sichuan Province of China National Tobacco Corporation (SCYC202410, SCYC202417, SCYC202112), the Young Elite Scientists Sponsorship Program of China National Tobacco Corporation (YCQTSC202401), and the Open Fund of Key Laboratory of Tobacco Pest Monitoring and Integrated Management in Tobacco Industry (KLTPIIMT2023-09).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding authors. E-mail: LI Maoye, limaoe81@ahau.edu.cn; LIU Su, suliu@ahau.edu.cn

Received: 2024-09-20; Accepted: 2024-11-07; Published online: 2024-12-06

Isolation and identification of *Beauveria bassiana* strains and test of their virulence to *Gonocephalum mongolicum*

ZHENG Nisha^{#1}, DENG Quan^{#2}, SHI Wen¹, GAO Yu¹, LI Xiang¹, LIU Dongyang², LIU Su^{*1}, LI Maoye^{*1}

1 Key Laboratory of Agri-products Quality and Biosafety, Ministry of Education, School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China

2 Liangshan Branch of Sichuan Tobacco Company, Xichang 615000, Sichuan, China

Abstract: [Background] Entomopathogenic fungi are important regulators of insect population dynamics in nature. However, the research of entomopathogenic fungi with high virulence to *Gonocephalum mongolicum* are scarce. **[Objective]** To isolate and identify entomopathogenic fungi and test the virulence of these fungi to *G. mongolicum*, providing ideas for the green prevention and control of *G. mongolicum*. **[Methods]** Entomopathogenic fungi were isolated from naturally infected *G. mongolicum* and identified by morphological and molecular biological methods. The corrected mortality rate of *G. mongolicum* adults and the median lethal time (LT_{50}) of the isolates were determined by an immersion method. **[Results]** The three fungal isolates were identified as *Beauveria bassiana* and designated Bb23, Bb24, and Bb25. The laboratory test results showed variations in the virulence among the three *B. bassiana* strains against *G. mongolicum* adults. Inoculation with the conidial suspension of Bb24 at a concentration of 1.0×10^8 CFU/mL resulted in a corrected mortality rate of 87.88% on day 20 and the LT_{50} of 6.74 days, while the corrected mortality rates of Bb23- and Bb25-treated *G. mongolicum* adults were 42.42% and 33.34%, respectively. **[Conclusion]** This study identifies three strains of *B. bassiana*, among which Bb24 displays the highest virulence to the adults of *G. mongolica* and has the potential for further development and utilization.

Keywords: *Beauveria bassiana*; *Gonocephalum mongolicum*; identification; virulence test; biocontrol

蒙古拟地甲(*Gonocephalum mongolicum*)属鞘翅目(Coleoptera)拟步甲科(Tenebrionidae),是作物苗期的主要害虫^[1]。蒙古拟地甲以幼虫和成虫危害烟草、蔬菜、果树实生苗等的幼芽嫩根,形成缺刻,严重时甚至缺苗断垄^[1]。目前,化学防治是控制蒙古拟地甲种群的主要手段,然而,长期使用化学农药不仅污染环境、降低农产品质量,还会导致害虫抗药性增加及杀伤非靶标生物等,引起一系列负面问题^[2-3]。因此,迫切需要开发蒙古拟地甲新型防控技术,以有效减少化学农药使用量。

昆虫病原真菌是一类能够直接从体表侵入

昆虫体内并迅速增殖,使昆虫感病致死的真菌^[4]。利用昆虫病原真菌开展害虫生物防治,不仅能有效降低化学农药用量,而且具有对非靶标生物安全、害虫不易产生抗性、有利于保护农田生态环境等优点^[5-6]。昆虫病原真菌包括诸多种类,其中研究最为广泛的是球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)。我国利用球孢白僵菌进行害虫生物防治的历史悠久,1956年即有使用球孢白僵菌防治甘薯象甲(*Cylas formicarius*)的报道^[7]。此后,球孢白僵菌的防治范围逐渐扩大,并在亚洲玉米螟(*Ostrinia furnacalis*)^[8]、马尾松毛虫(*Dendrolimus punctatus*)^[9]、棉铃虫(*Helicoverpa*

armigera)^[10]、草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)^[11]等重大农林业害虫的防治中取得了良好的效果,有效保障了我国粮食安全和生态安全。目前,虽有一些商品化的球孢白僵菌菌剂,但是能够高效防治蒙古拟地甲的球孢白僵菌仍然极为缺乏,相关的研究报道也非常少见,限制了蒙古拟地甲生物防治技术的研发和推广。

本研究从田间采集染菌蒙古拟地甲僵虫并对真菌进行分离,通过形态学和分子生物学手段鉴定真菌种类,并进一步研究了它们的生物学特性及对蒙古拟地甲的毒力,以期对蒙古拟地甲的生物防治提供优良的菌株资源。

1 材料与方 法

1.1 样 品

本研究所用蒙古拟地甲成虫均采集于四川省凉山彝族自治州冕宁县回坪乡烟田,将成虫带回实验室,饲养于方形塑料饭盒(长 22 cm,宽 15 cm,高 7 cm)中。饭盒底部预先铺设一层 2–3 cm 厚的灭菌土壤(过 40 目筛),并放置新鲜烟草叶片供其取食(每 2 d 更换 1 次)。

1.2 培养基

萨氏(sabouraud dextrose agar with yeast extract, SDAY)培养基(g/L): 酵母粉 10.0、蛋白胨 10.0、葡萄糖 40.0、琼脂粉 20.0,自然 pH。

1.3 主要试剂和仪器

柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司;2×Taq Master Mix,康为世纪生物科技股份有限公司;DL2000 DNA marker, 兰杰柯科技有限公司;引物合成与基因测序工作均委托通用生物(安徽)有限公司完成。扫描电子显微镜,日立公司;PCR 扩增仪,东胜兴业科技有限公司;电泳仪,北京六一生物科技有限公司;人工气候箱,宁波江南仪器厂;涡旋振荡器, IKA 公司;离子溅射仪,北京中科科仪股份有限公司。

1.4 蒙古拟地甲僵虫采集及菌株分离

参考 Lu 等^[12]的方法,在超净工作台中,将

蒙古拟地甲僵虫浸泡在 30 mL 75%酒精中消毒 30 s,随后用 30 mL 无菌水漂洗 3 次,并用无菌滤纸吸干僵虫体表水分。用灭菌的剪刀将虫体剪成 3 块,分别接种于含 0.1 g/L 氯霉素的 SDAY 培养基上,于(25±1) °C、90%相对湿度、光周期 14 L:10 D 条件下培养,待僵虫体表周围长出新菌丝,用接种环挑取边缘菌丝,在 SDAY 培养基表面划线,培养 3–5 d 后继续挑取生长出的单菌落接至新的 SDAY 培养基上,重复操作 3 次,最终得到 3 株纯化的真菌菌株,接种至 SDAY 斜面培养基上,4 °C 保存备用。

1.5 菌株的形态学观察

将分离得到的 3 株真菌接种到 SDAY 培养基上,于(25±1) °C、90%相对湿度、光周期 14 L:10 D 条件下培养 15 d,观察菌落的形态和颜色等,拍照记录。

1.6 菌落直径、产孢量和孢子萌发率测定

将供试菌株接种于 SDAY 培养平板上,采用十字交叉法,分别于接种后 5、10 和 15 d 测量菌落横径和纵径,根据公式(1)计算菌落直径。接种后 15 d,用灭菌打孔器(直径 5 mm)自菌落中心点至边缘距离的 1/2 处打取 4 个菌饼,置于装有 20 mL 0.05% Tween-80 溶液的离心管中,用高速漩涡振荡器振荡 10 min,使孢子均匀分散,在显微镜下用血球计数板统计孢子数量,根据公式(2)计算产孢量。将供试菌株配制成 1.0×10^6 CFU/mL 的孢子悬浮液,吸取 10 μ L 滴在水琼脂玻片上,于(25±1) °C、90%相对湿度、光周期 14 L:10 D 环境下培养 18 h 后,镜检孢子萌发情况。每个处理随机选取 5 个视野,根据公式(3)计算萌发率,芽管长度超过孢子直径长度一半记为萌发。以上实验均设 3 次生物学重复。

$$\text{菌落直径(mm)} = (\text{菌落横径} + \text{菌落纵径}) / 2 \quad (1)$$

$$\text{产孢量(个/cm}^2\text{)} = \text{孢子总数} / 80 \text{ 格} \times 400 \times 10^4 \times \text{稀释倍数/打孔器面积} \quad (2)$$

$$\text{萌发率(\%)} = (\text{视野 1} + \text{视野 2} + \text{视野 3} + \text{视野 4} + \text{视野 5}) / 5 \times 100 \quad (3)$$

1.7 扫描电子显微镜样品制备

参照张瀚文等^[13]的方法进行样品制备与观察。将 3 株供试菌株在 SDAY 培养基上于 (25±1) °C、90%相对湿度、光周期 14 L:10 D 条件下培养 10 d, 取 0.5 cm 见方的带有菌丝和分生孢子的凝胶块, 立即放入 4 °C 预冷的戊二醛固定液中固定 12 h, 钨酸固定 12 h。样品随后经 0.1 mol/L PBS (Na₂HPO₄·12H₂O 2.72 g, NaH₂PO₄·2H₂O 0.28 g, NaCl 0.9 g, 溶于 1 000 mL 双蒸水中, 4 °C 保存) 缓冲液洗涤 3 次, 每次 20 min。接着, 样品依次用 30%、50%、70%、80%、95%、100% 乙醇逐级脱水处理, 每次 20 min, 再用 100% 丙酮溶液置换 2 次, 每次 20 min。经 CO₂ 临界点干燥 2 h 后, 用导电胶将样品粘于扫描电子显微镜样品台上, 使用离子溅射仪进行喷金处理后, 将样品置于扫描电子显微镜下观察和拍照。

1.8 菌株的分子生物学鉴定

使用柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取各菌株的基因组 DNA。采用通用引物(表 1)扩增各菌株的 ITS、 β -tubulin 和 18S rRNA 基因序列。PCR 反应体系(50.0 μ L): 2×Taq Master Mix 25.0 μ L, 引物(10.0 μ mol/L)各 2.0 μ L, DNA 模板 1.0 μ L, ddH₂O 20.0 μ L。反应条件: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 2 min。使用琼脂糖凝胶电泳验证产物大小。PCR 产物纯化后测序, 将序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对分析, 使用 MEGA 11.0 软件采用邻接(neighbor-joining)法构建系统发育树。

表 1 本实验所用的引物

Table 1 Primers used in this study

基因	引物	序列
Gene	Primer	Sequence (5'→3')
ITS	ITS1F	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
	ITS4R	TCCTCCGCTTATTGATATGC
18S rRNA	NS1	GTAATCATATGCTTGTCTC
	NS2	GGCTGCTGGCACCACACTTGC
β -tubulin	Bt1 F	GGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCC
	Bt1 R	CAGCCATCATGTTCTTAGGGTC

1.9 昆虫病原真菌对蒙古拟地甲的室内毒力测定

用灭过菌的刮铲从 SDAY 平板上刮取生长 15 d 的孢子至三角瓶中, 加入灭菌的 0.05% Tween-80 水溶液, 使用涡旋振荡器振荡 15 min, 使孢子和菌丝充分分离。用 2 层擦镜纸滤去菌丝, 获得孢子悬浮液。使用血球计数板计算孢子悬浮液的浓度, 并将其稀释至 1.0×10⁸ CFU/mL。选取体型一致且健康活泼的蒙古拟地甲成虫, 采用浸虫法^[13-14]将 3 株真菌的孢子悬浮液接种至蒙古拟地甲成虫, 以 0.05% Tween-80 水溶液处理为对照。每个处理 3 次重复, 每次重复包含 30 头成虫。从接种的第 2 天起, 每天观察试虫状态, 记录死虫数, 连续观察 20 d, 并按公式(4)计算校正死亡率, 对死虫进行保湿观察, 若虫体表面长出白色菌丝, 则判定为因染菌而死亡。

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% (4)

1.10 数据处理

使用 Excel 软件对实验数据进行初步统计, 采用 DPS v19.05 软件计算致死中时(medium lethal time, LT₅₀)值。以 Duncan 氏新复极差法进行显著差异性检验, 显著性水平设为 P<0.05。

2 结果与分析

2.1 昆虫病原真菌的形态特征及生物学测定结果

染菌蒙古拟地甲僵虫采集自四川省凉山彝族自治州会东县嘎吉镇烟田(图 1)。从蒙古拟地甲僵虫上分离得到 3 株昆虫病原真菌, 编号为 Bb23、Bb24 和 Bb25。3 个菌株在 SDAY 培养基上培养 15 d 后形态如图 2 所示, 菌株 Bb23 菌落为绒毛状, 中央气生菌丝突起, 向外气生菌丝减少, 最外圈有一圈很窄的生长扩散区, 菌落背面深黄色, 有明显轮纹; 菌株 Bb24 菌落整体蓬松, 中间为凸起毛毡状, 疏松, 边缘菌丝呈绒毛放射状, 背面深黄色, 有明显轮纹; Bb25 菌落中心为淡黄色粉状, 向外一圈凸起呈毛毡状,

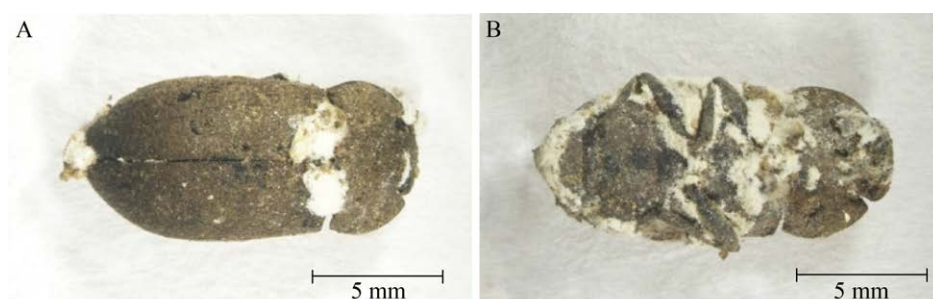


图 1 田间采集的蒙古拟地甲染菌僵虫 A: 背面; B: 腹面。

Figure 1 Field-collected *Gonocephalum mongolicum* infected by entomopathogenic fungi. A: Dorsal view; B: Ventral view.

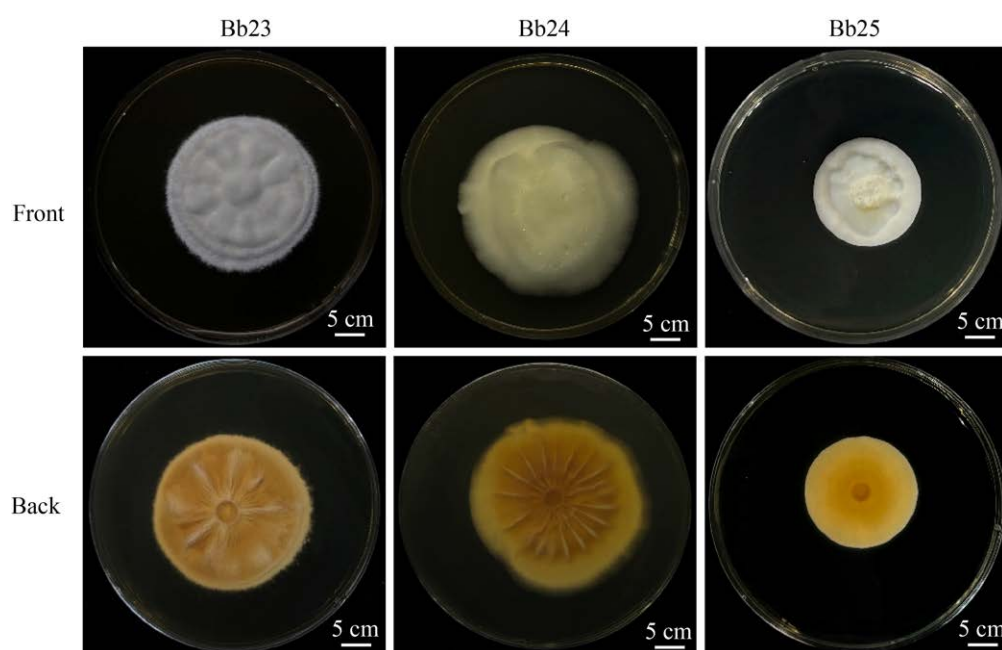


图 2 三株真菌在 SDAY 培养基上的菌落形态

Figure 2 Morphological characteristics of three fungal strains on SDAY medium.

菌落背面淡黄色, 有褐色环, 无明显轮纹。供试菌株培养 15 d 的菌落直径介于 34.8–40.5 mm 之间(表 2), 其中菌株 Bb23 生长最快, 15 d 菌落直径为 40.5 mm; 菌株 Bb24 生长速率次之, Bb25 生长最慢。菌株 Bb24 的产孢量和孢子萌发率均最高, 分别为 $(6.11 \pm 0.34) \times 10^7$ 个/cm² 和 $(93.07 \pm 0.16)\%$, 显著高于菌株 Bb23 和菌株 Bb25。

2.2 孢子的扫描电子显微镜观察结果

使用扫描电子显微镜观察菌株 Bb23、Bb24 和 Bb25 的菌丝、产孢结构及分生孢子, 结果见

图 3。由图 3 可见, 3 株真菌的菌丝均细长、具分枝, 分生孢子梗弯曲、具分枝(图 3)。分生孢子梗单生或簇生于菌丝上, 产孢结构端部膨大, 分生孢子着生在产孢结构延伸的“之”字形上, 顶端瓶梗状, 分生孢子生长浓密, 圆形或卵形。基于上述形态学特征, 初步判断菌株 Bb23、Bb24 和 Bb25 均为球孢白僵菌。

2.3 昆虫病原真菌的分子生物学鉴定结果

琼脂糖凝胶电泳显示, 菌株 Bb23、Bb24

表 2 三株供试真菌在 SDAY 培养基上的培养性状
Table 2 Cultivation characteristics of three fungal strains on SDAY medium

培养性状 Cultivation characteristics	培养时间 Incubation time	菌株 Strain		
		Bb23	Bb24	Bb25
菌落直径 Colony diameter (mm)	5 d	18.30±0.34a	17.40±0.24b	15.80±0.19c
	10 d	31.70±0.27a	30.40±0.64b	27.80±0.26c
	15 d	40.50±0.24a	39.30±0.59b	34.80±0.67c
产孢量 Sporulation capacity (×10 ⁷ /cm ²)	15 d	4.24±0.24b	6.11±0.34a	3.15±0.14c
萌发率 Germination rate (%)	18 h	89.77±0.12b	93.07±0.16a	88.20±0.27c

不同小写字母表示差异显著。
Different lowercase letters indicate significant differences.

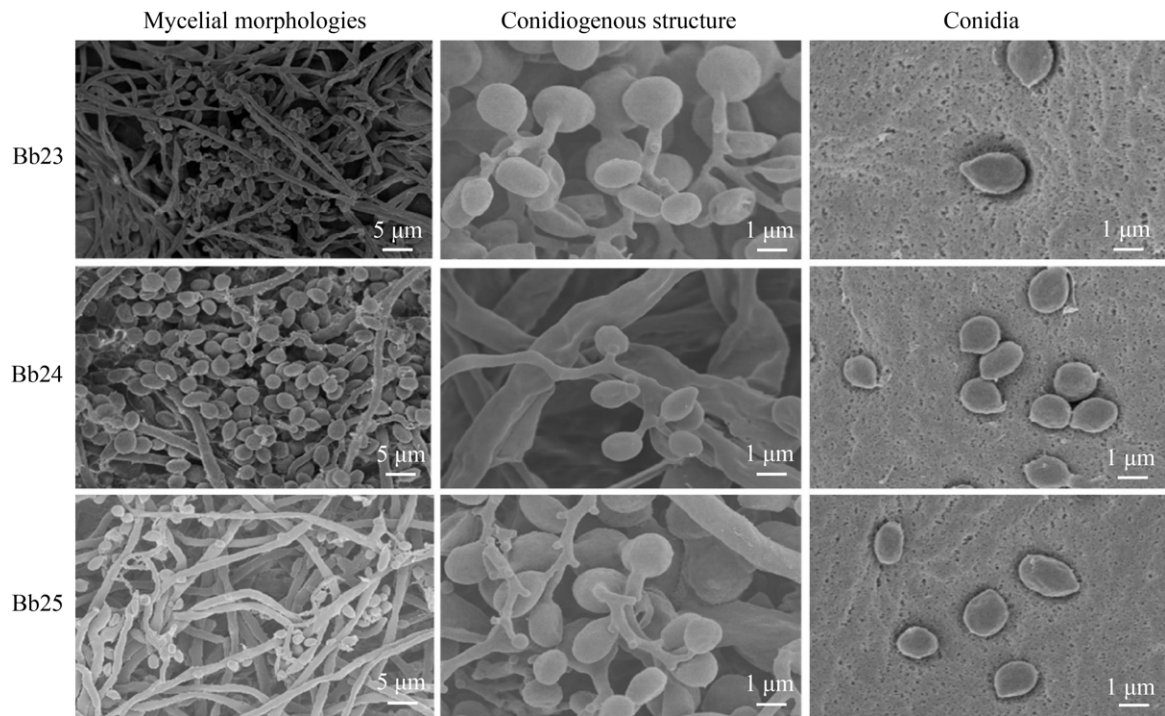


图 3 三株菌株在扫描电子显微镜下的形态特征
Figure 3 Morphological characteristics of three fungal strains under scanning electron microscopy.

和 Bb25 的 ITS 序列的扩增产物长度分别为 556、560 和 563 bp， β -tubulin 扩增产物长度分别为 633、642 和 629 bp，18S rRNA 基因扩增产物分别为 1 320、1 327 和 1 329 bp (图 4)。将扩增产物测序，并将测序结果进行 BLAST 比对分析。结果显示，这些序列与 GenBank 中登记的球孢白僵菌序列的相似性均超过 99%。

基于 18S rRNA 序列构建了系统发育树

(图 5A)，结果显示，菌株 Bb23 和 Bb25 与球孢白僵菌 CauBb36 (MW633214.1)处于进化树同一分支，菌株 Bb24 与球孢白僵菌 IM2 (MW774894.1)处于进化树同一分支。进一步以 β -tubulin 和 18S rRNA 序列构建了系统发育树，发现 3 个菌株均与球孢白僵菌的亲缘关系最近 (图 5B、5C)。因此，鉴定菌株 Bb23、Bb24 和 Bb25 均为球孢白僵菌。

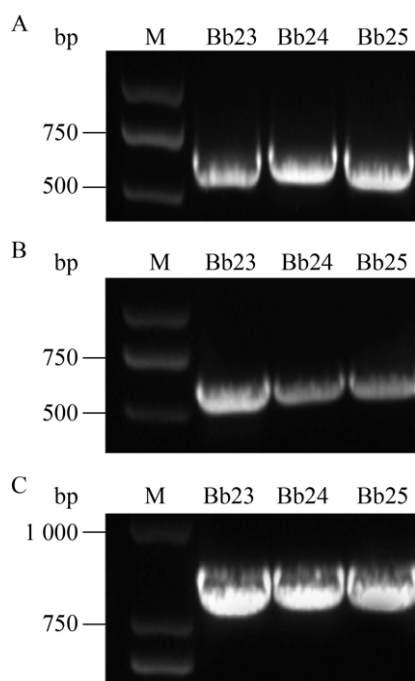


图4 PCR扩增3株真菌的ITS (A)、 β -tubulin (B) 和 18S rRNA (C) 序列

Figure 4 PCR amplification of ITS (A), β -tubulin (B), and 18S rRNA (C) sequences from three fungal strains.

使用 3 个菌株的孢子悬浮液 (浓度 1×10^8 CFU/mL) 处理蒙古拟地甲成虫, 结果表明 (表 3), 菌株 Bb24 的毒力最高, 处理后 20 d 试虫校正死亡率为 87.88%, 显著高于菌株 Bb23 和 Bb25。菌株 Bb24 对蒙古拟地甲的 LT_{50} 值为 6.74 d, 显著小于菌株 Bb23 和 Bb25。

观察了蒙古拟地甲成虫被菌株 Bb24 侵染后的症状, 接种后 5 d 试虫头部、口器、前胸背板、节间褶及足开始出现白色菌丝, 接种后 10 d 试虫大量死亡, 僵虫足部蜷缩, 体表遍布白色菌丝 (图 6)。

3 讨论

对未知种类的昆虫病原真菌进行鉴定, 除了观察真菌的形态学特征之外, 还需要结合分子生物学手段, 从而更准确地区分昆虫病原真菌的种属。前人研究表明, 使用单一基因序列对真菌进行分子生物学鉴定存在偏差, 而同时

使用多个基因能够显著提高鉴定的准确性。ITS、 β -tubulin 和 18S rRNA 基因是常用的用于真菌物种鉴定的基因序列, 这些序列已被广泛用于球孢白僵菌的分子鉴定中^[15-17]。本文基于 ITS、 β -tubulin 和 18S rRNA 基因序列构建了系统进化树, 证明菌株 Bb23、Bb24 和 Bb25 均为球孢白僵菌。3 株菌株的鉴定为下一步开展球孢白僵菌防治蒙古拟地甲的研究及生产应用奠定了基础。

昆虫病原真菌的生长速率和产孢量等生物学性状通常与其毒力存在相关性, 较快的生长速率和较高的产孢量能够加速真菌对昆虫的侵染^[18-21]。王定锋等^[22]的研究发现, 布氏白僵菌 (*Beauveria brongniartii*) Bbr1552 在菌落直径、萌发率和产孢量上均显著优于对照菌株, 并且对茶丽纹象甲表现出高毒力。张慧等^[23]和何学友等^[24]的研究均表明, 白僵菌的萌发速率、产孢量与毒力之间存在正相关。本研究测定了 3 株球孢白僵菌的生长速率、产孢量和孢子萌发率, 结果表明, 在 3 株菌株中, 菌株 Bb24 的生长速率虽然并非最快, 但产孢量和萌发率均最高, 其对蒙古拟地甲的毒力也显著高于其他 2 株菌株, 这与上述学者的研究结果一致。

此前, 本实验室李银平等^[25]发现球孢白僵菌 Bb06 对蒙古拟地甲成虫的毒力较高, 菌株 Bb06 处理 20 d 后, 蒙古拟地甲成虫的校正死亡率为 82.97%, LT_{50} 值为 11.09 d。本研究中分离的菌株 Bb24 毒力更强, 处理后 20 d 的校正死亡率达到 87.88%; LT_{50} 值更小, 仅为 6.74 d。因此, 菌株 Bb24 在蒙古拟地甲防治中具有进一步开发利用的潜力。

本研究发现, 菌株 Bb23、Bb24 和 Bb25 虽然分离自同一蒙古拟地甲僵虫, 但 3 株菌株的毒力存在显著差异, 其中菌株 Bb24 侵染蒙古拟地甲成虫 20 d 校正死亡率为 87.88%, 而菌株 Bb23 和 Bb25 校正死亡率仅为 42.42% 和 33.34%。前人也报道了类似的现象, 如王砚妮等^[26]从草地贪夜蛾僵虫上分离获得 3 株球孢白僵菌 Bbyn-1、

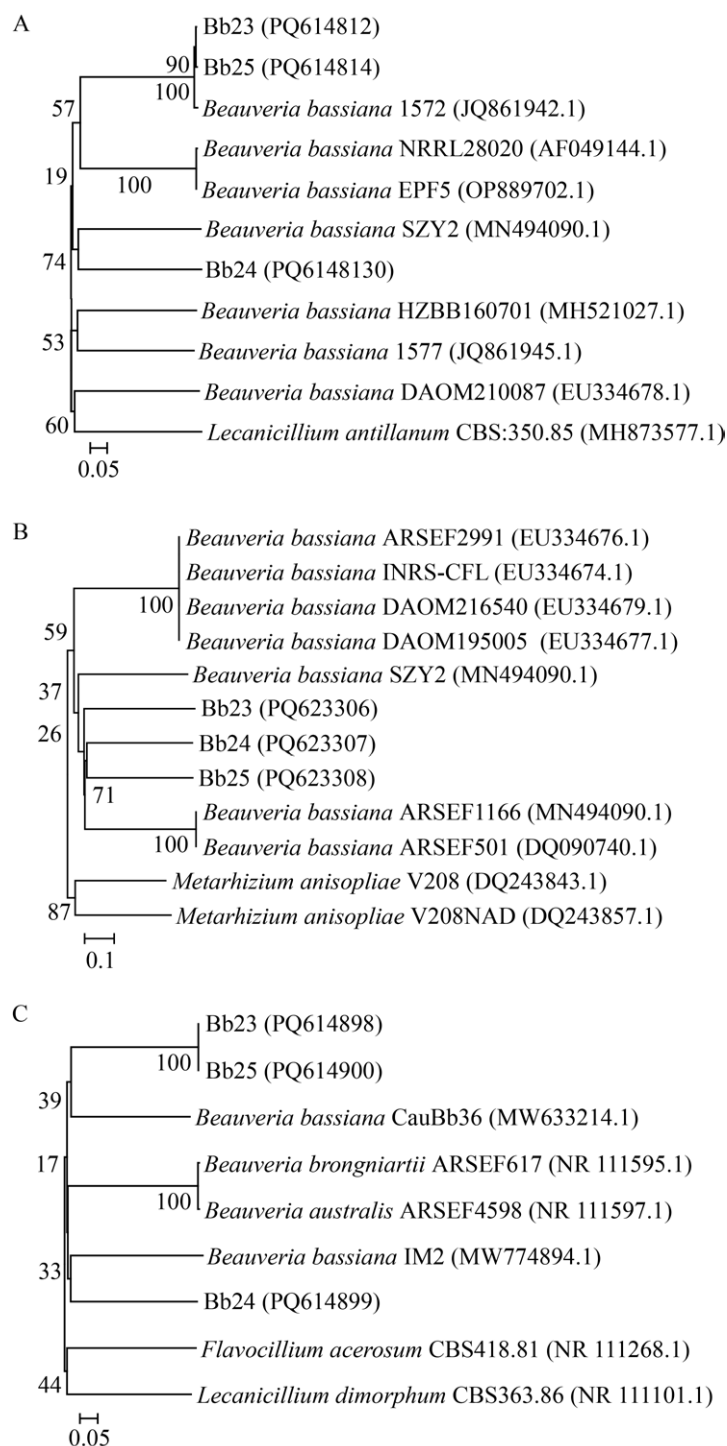


图5 基于 ITS (A)、 β -tubulin (B)和 18S rRNA 基因(C)序列构建的系统发育树 括号内为已知菌株在 GenBank 中的登录号; 各分支上的数字表示置信度, 标尺 0.05 和 0.1 代表序列的进化差异。

Figure 5 A phylogenetic tree based on gene sequences from ITS (A), β -tubulin (B) and 18S rRNA gene (C). The numbers in parentheses represent GenBank accession numbers. The numbers in each branch point denote the percentages supported by bootstrap. The scale bar 0.05 and 0.1 represents sequence variance.

表 3 三株球孢白僵菌对蒙古拟地甲成虫的致病力

Table 3 Pathogenicity of three *Beauveria bassiana* strains against the adults of *Gonocephalum mongolicum*

Item	Strain Bb23	Strain Bb24	Strain Bb25
校正死亡率 Corrected mortality rate (%)	42.42±5.46b	87.88±3.03a	33.34±4.04c
毒力回归方程 Regression equation	$Y=2.29X+2.10$	$Y=2.60X+2.84$	$Y=2.67X+1.46$
相关系数 Correlation coefficient (r)	0.98	0.98	0.95
LT_{50} (d)	14.78±2.08b	6.74±0.60c	21.24±1.84a
95%置信区间 95% confidence interval	15.35–24.42	6.00–7.44	17.20–29.71

不同小写字母表示差异显著。

Different lowercase letters indicate significant differences.

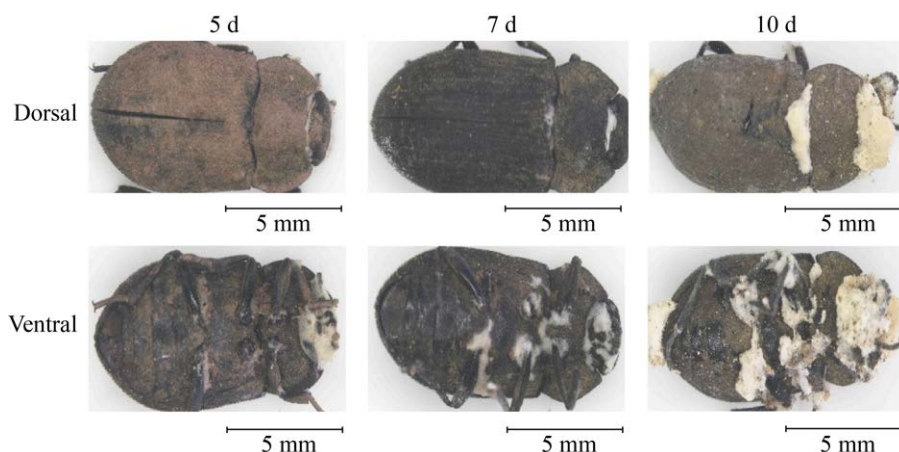


图 6 蒙古拟地甲成虫感染菌株 Bb24 后不同时期的症状

Figure 6 Symptoms of Bb24 infected with *Gonocephalum mongolicum* adults at different stages.

Bbyn-2 和 Bbyn-3, 这 3 个菌株对草地贪夜蛾幼虫的毒力存在显著差异。温绍海等^[27]从蠋螬僵虫上分离得到 2 株球孢白僵菌 YY-1 和 HNC-1, 毒力测定结果表明, 菌株 YY-1 对草地贪夜蛾幼虫的毒力显著高于菌株 HNC-1。推测产生这一现象的原因与菌株的寄主专化性及与宿主的相互作用有关^[28]。此外, 本研究中发现菌株 Bb24 侵染蒙古拟地甲后, 试虫行动迟缓, 虫体逐渐僵化, 这可能是由于球孢白僵菌在虫体血腔内增殖, 消耗寄主营养并破坏虫体组织所致。最终, 蒙古拟地甲死亡, 其头部和节间褶处出现白色菌丝和孢子。这些孢子可作为侵染源, 在田间持续控制蒙古拟地甲种群数量。后续将开展菌株 Bb24 对蒙古拟地甲不同龄期幼虫和蛹的毒力测定, 并评价菌株 Bb24 对蒙古拟地甲的田间防效, 为开发蒙古拟地甲生物防治技术奠定基础。

4 结论

本研究从田间采集的染菌蒙古拟地甲僵虫上分离得到 3 株昆虫病原真菌。通过形态学和分子生物学鉴定, 确定 3 株真菌均为球孢白僵菌。进一步研究 3 个菌株生物学基本特性, 菌株 Bb24 菌落直径为 39.3 mm, 产孢量和孢子萌发率分别为 $(6.11 \pm 0.34) \times 10^7/\text{cm}^2$ 和 $(93.07 \pm 0.16)\%$ 。实验表明, 菌株 Bb24 毒力最强, 处理后 20 d 的校正死亡率达 87.88%; LT_{50} 值为 6.74 d。而菌株 Bb23 和 Bb25 处理组试虫校正死亡率分别为 42.42% 和 33.34%。

作者贡献声明

郑妮莎、邓全: 实验及数据收集、数据分析、图表制作、论文撰写; 石文、高宇、李响、

刘东阳: 实验及数据收集; 刘苏、李茂业: 研究基金获取、提出研究主题和研究问题、项目管理及监督、论文修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] 吉志新, 王飞, 王长青, 崔桂玲. 蒙古沙潜不同发育时期酯酶和过氧化物酶同工酶的比较分析[J]. 河北科技师范学院学报, 2007, 21(2): 19-22.
JI ZX, WANG F, WANG CQ, CUI GL. Comparative study on esterase isoenzymes and peroxidase isoenzymes of *Gonocephalum reticulatum* mostschulsky at different developmental stages[J]. Journal of Hebei Normal University of Science & Technology, 2007, 21(2): 19-22 (in Chinese).
- [2] PARVEN A, KHAN MSI, PRODHAN MDH, VENKATESWARLU K, MEGHARAJ M, MEFTAU IM. Human health risk assessment through quantitative screening of insecticide residues in two green beans to ensure food safety[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2021, 103: 104121.
- [3] GUO WX, YAN X, ZHAO GY, CHEN JH, HAN RC. Efficacy of entomopathogenic *Steinernema* and *Heterorhabditis* nematodes against *Holotrichia oblita*[J]. Journal of Pest Science, 2015, 88(2): 359-368.
- [4] RAJULA J, RAHMAN A, KRUTMUANG P. Entomopathogenic fungi in Southeast Asia and Africa and their possible adoption in biological control[J]. Biological Control, 2020, 151: 104399.
- [5] MANTZOUKAS S, ELIOPOULOS PA. Endophytic entomopathogenic fungi: a valuable biological control tool against plant pests[J]. Applied Sciences, 2020, 10(1): 360.
- [6] ISLAM W, ADNAN M, SHABBIR A, NAVEED H, ABUBAKAR YS, QASIM M, TAYYAB M, NOMAN A, NISAR MS, KHAN KA, ALI H. Insect-fungal-interactions: a detailed review on entomopathogenic fungi pathogenicity to combat insect pests[J]. Microbial Pathogenesis, 2021, 159: 105122.
- [7] 林伯欣. 应用白僵病菌防除甘薯象鼻虫初报[J]. 昆虫学报, 1956(4): 539-540.
LIN BX. A preliminary report on the utilization of the muscardine fungus, *Beauveria bassiana* (bals.), to control the sweet-potato weevil, *Cylas formicarius* fab[J]. Acta Entomologica Sinica, 1956(4): 539-540 (in Chinese).
- [8] 徐文静, 隋丽, 高鹏, 张荣宝, 王翌, 张正坤, 李启云. 球孢白僵菌可湿性粉剂防治玉米螟的研究与应用[J]. 中国生物防治学报, 2020, 36(6): 862-865.
XU WJ, SUI L, GAO P, ZHANG RB, WANG Z, ZHANG ZK, LI QY. Study and application of wettable powder of *Beauveria bassiana* to control corn borer[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2020, 36(6): 862-865 (in Chinese).
- [9] 耿存娟, 夏永刚, 孙凯, 夏登科, 谢曦珍, 蓝京. 无人机喷撒白僵菌防治越冬代马尾松毛虫效果研究[J]. 湖南林业科技, 2021, 48(3): 69-72.
GENG CJ, XIA YG, SUN K, XIA DK, XIE XZ, LAN J. Study on preventive controlling *Dendrolimus punctatus* by unmanned aerial vehicle spraying *Beauveria bassiana*[J]. Hunan Forestry Science & Technology, 2021, 48(3): 69-72 (in Chinese).
- [10] 曹伟平, 丰硕, 程佳旭, 陈丹, 吴青君, 宋健. 布氏白僵菌菌株 JG-17 的鉴定及对 3 种金龟子的毒力测定[J]. 中国农业科学, 2024, 57(12): 2364-2377.
CAO WP, FENG S, CHENG JX, CHEN D, WU QJ, SONG J. Species identification of *Beauveria brongniartii* strain JG-17 and virulence against three Scarabaeoidae pests[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2024, 57(12): 2364-2377 (in Chinese).
- [11] 张维, 彭国雄, 夏玉先. 昆虫病原真菌防控草地贪夜蛾的现状、问题与展望[J]. 中国生物防治学报, 2019, 35(5): 674-681.
ZHANG W, PENG GX, XIA YX. Current status, problems and prospects of entomopathogenic fungi in controlling fall armyworm *Spodoptera frugiperda*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2019, 35(5): 674-681 (in Chinese).
- [12] LU LM, CHENG BP, DU DC, HU XR, PENG AT, PU ZX, ZHANG XY, HUANG ZD, CHEN GQ. Morphological, molecular and virulence characterization of three *Lecanicillium* species infecting Asian Citrus psyllids in Huangyan Citrus groves[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2015, 125: 45-55.
- [13] 张瀚文, 陈汝婷, 许建娇, 石鹏, 杨青山, 韩俊, 初奎, 宇佳, 迟德富. 球孢白僵菌侵染长林小蠹的致病性及侵染显微观察[J]. 中南林业科技大学学报, 2024, 44(2): 62-72.
ZHANG HW, CHEN RT, XU JJ, SHI P, YANG QS, HAN J, CHU K, YU J, CHI DF. Scanning electron microscopy and pathogenicity of *Beauveria bassiana* infection with *Hylurgus ligniperda*[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2024, 44(2): 62-72 (in Chinese).
- [14] 龙秀珍, 高旭渊, 曾宪儒, 何瞻, 韦德卫, 江小冬, 曾涛, 于永浩. 一株莱氏绿僵菌的筛选及其对草地贪夜蛾的毒力[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(6): 1111-1119.
LONG XZ, GAO XY, ZENG XR, HE Z, WEI DW, JIANG XD, ZENG T, YU YH. Screening of a *Metarhizium rileyi* strain and its virulences to *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2021, 37(6): 1111-1119 (in Chinese).
- [15] 程茵, 郑吉阳, 王敦. 三株球孢白僵菌的分离鉴定与其对粘虫的室内毒力[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(2): 521-530.
CHENG Y, ZHENG JY, WANG D. Isolation and identification of three *Beauveria bassiana* isolates and their virulence against *Mythimna separata* under laboratory condition[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2022, 38(2): 521-530 (in Chinese).
- [16] 赵玉雪, 朱佳敏, 杨霞, 吴柳燕, 赵奕. 一株对核桃长足象具有强致病力球孢白僵菌的分离与鉴定[J]. 东北林业大学学报, 2023, 51(5): 154-158.
ZHAO YX, ZHU JM, YANG X, WU LY, ZHAO Y. Isolation and identification of *Beauveria bassiana* with

- high pathogenicity to *Alcidodes juglans* Chao[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2023, 51(5): 154-158 (in Chinese).
- [17] 付楠霞, 罗宗秀, 李兆群, 边磊, 修春丽, 陈宗懋, 蔡晓明. 一株球孢白僵菌的分离鉴定及其对茶丽纹象甲幼虫的室内致病力测定[J]. 中国生物防治学报, 2023, 39(5): 1104-1112.
FU NX, LUO ZX, LI ZQ, BIAN L, XIU CL, CHEN ZM, CAI XM. Isolation, identification, and pathogenicity of a *Beauveria bassiana* strain isolated from tea weevils *Mylocherinus aurilineatus* larvae[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2023, 39(5): 1104-1112 (in Chinese).
- [18] 刘明科, 闫芳芳, 齐禹哲, 黄岩, 闫雪梨, 钱逸彬, 李茂业. 对桃蚜高毒力的蜡蚧菌菌株筛选[J]. 昆虫学报, 2020, 63(6): 751-758.
LIU MK, YAN FF, QI YZ, HUANG Y, YAN XL, QIAN YB, LI MY. Screening of *Lecanicillium* strains with high virulence to *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae)[J]. Acta Entomologica Sinica, 2020, 63(6): 751-758 (in Chinese).
- [19] 齐禹哲, 闫芳芳, 李成军, 刘苏, 陈鹏, 徐传涛, 李茂业, 刘明科, 闫雪梨, 李斌. 烟草甲幼虫高毒力病原真菌的筛选[J]. 中国烟草科学, 2021, 42(5): 57-62, 68.
QI YZ, YAN FF, LI CJ, LIU S, CHEN P, XU CT, LI MY, LIU MK, YAN XL, LI B. Screening for highly virulent entomopathogenic fungi against *Lasioderma serricorne* (Fabricius) larvae[J]. Chinese Tobacco Science, 2021, 42(5): 57-62, 68 (in Chinese).
- [20] 孟祥坤, 朱超, 于新, 刘元军, 胡兆平, 范玲超. 高毒力白僵菌的筛选及对花生甜菜夜蛾的致病力[J]. 中国生物防治学报, 2018, 34(2): 259-265.
MENG XK, ZHU C, YU X, LIU YJ, HU ZP, FAN LC. Screening of highly pathogenic *Beauveria bassiana* strain and its virulence against peanut beet armyworm[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2018, 34(2): 259-265 (in Chinese).
- [21] 胡本进, 徐丽娜, 胡飞, 周子燕, 李昌春. 稻蛀茎夜蛾高致病性球孢白僵菌菌株筛选[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(2): 280-283.
HU BJ, XU LN, HU F, ZHOU ZY, LI CC. Screening of highly pathogenic strains of *Beauveria bassiana* against *Sesamia inferens*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2015, 31(2): 280-283 (in Chinese).
- [22] 王定锋, 李良德, 李慧玲, 张辉, 吴光远. 一株对茶丽纹象甲高毒力白僵菌菌株的筛选、鉴定与培养研究[J]. 茶叶科学, 2021, 41(1): 101-112.
WANG DF, LI LD, LI HL, ZHANG H, WU GY. Screening, identification and culture conditions of a high-virulent isolate of *Beauveria* against *Mylocherinus aurilineatus*[J]. Journal of Tea Science, 2021, 41(1): 101-112 (in Chinese).
- [23] 张慧, 吴圣勇, 李娟, 张璐璐, 张林雅, 雷仲仁. 不同培养基继代培养球孢白僵菌对西花蓟马毒力和产孢量的影响[J]. 中国农业科学, 2016, 49(15): 2977-2987.
ZHANG H, WU SY, LI J, ZHANG LL, ZHANG LY, LEI ZR. Influence of subculture on virulence to *Frankliniella occidentalis* and conidial production of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2016, 49(15): 2977-2987 (in Chinese).
- [24] 何学友, 蔡守平, 童应华, 熊瑜, 黄勇, 谢家冬, 陈顺立. 球孢白僵菌和金龟子绿僵菌不同菌株对黑足角胸叶甲成虫的致病力评价[J]. 昆虫学报, 2011, 54(11): 1281-1287.
HE XY, CAI SP, TONG YH, XIONG Y, HUANG Y, XIE JD, CHEN SL. Pathogenicity evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against adults of *Basilepta melanopus* (Coleoptera: Eumolpidae)[J]. Acta Entomologica Sinica, 2011, 54(11): 1281-1287 (in Chinese).
- [25] 李银平, 柴茵, 梁佳惠, 江连强, 李茂业, 刘苏. 蒙古拟地甲成虫高致病力球孢白僵菌的筛选[J]. 生物灾害科学, 2023, 46(1): 12-16.
LI YP, CHAI Y, LIANG JH, JIANG LQ, LI MY, LIU S. Screening of *Beauveria bassiana* strains with high pathogenicity against the adults of *Gonocephalum mongolicum*[J]. Biological Disaster Science, 2023, 46(1): 12-16 (in Chinese).
- [26] 王砚妮, 李敏, 段先莉, 龙同, 李文静, 赵锦芳. 三株球孢白僵菌对小菜蛾室内毒力测定[J]. 湖北工业大学学报, 2023, 38(2): 40-43.
WANG YN, LI M, DUAN XL, LONG T, LI WJ, ZHAO JF. Virulence of three strains of *Beauveria bassiana* against *Plutella xylostella*[J]. Journal of Hubei University of Technology, 2023, 38(2): 40-43 (in Chinese).
- [27] 温绍海, 庞继鑫, 杜广祖, 陈斌, 张立敏. 2株感染蠖蛾的球孢白僵菌的分离鉴定及对草地贪夜蛾的毒力[J]. 植物保护, 2022, 48(4): 318-323, 362.
WEN SH, PANG JX, DU GZ, CHEN B, ZHANG LM. Isolation and identification of two *Beauveria bassiana* strains from the infected earwig and their virulence to *Spodoptera frugiperda* larvae[J]. Plant Protection, 2022, 48(4): 318-323, 362 (in Chinese).
- [28] 蒲顺昌, 秦丽, 陈名君, 蔡悦, 黄勃. 马尾松林中球孢白僵菌寄主转移和专化性的 SSR 标记分析[J]. 菌物学报, 2013, 32(4): 698-709.
PU SC, QIN L, CHEN MJ, CAI Y, HUANG B. Host shift and host specificity analysis of *Beauveria bassiana* in Masson's pine plantation based on SSR molecular marker[J]. Mycosystema, 2013, 32(4): 698-709 (in Chinese).