

研究报告

一株感染家蚕的高致病性白僵菌的筛选及复合诱变

刘晨浩¹, 李维宏^{*1}, 杨宁²

1 山西农业大学资源环境学院, 山西 晋中 030800

2 山西农业大学食品科学与工程学院, 山西 晋中 030800

刘晨浩, 李维宏, 杨宁. 一株感染家蚕的高致病性白僵菌的筛选及复合诱变[J]. 微生物学通报, 2023, 50(8): 3495-3505.

LIU Chenhao, LI Weihong, YANG Ning. Screening and compound mutagenesis of a highly pathogenic *Beauveria bassiana* strain infecting silkworm[J]. Microbiology China, 2023, 50(8): 3495-3505.

摘要:【背景】白僵蚕中的生物活性物质在医疗、保健品及化妆品行业有着广泛的应用。目前,许多人工养殖僵蚕基地在实际生产中使用的菌种多为未进行纯化优选的自然感病死亡僵蚕孢子粉且无固定的施用浓度,使得蚕的僵化死亡率难以保证。提高白僵菌菌株的致病力并筛选性状优良的高毒力菌株是工厂化生产白僵蚕研发的重要方向。【目的】利用紫外-微波复合诱变技术筛选高毒力菌株,为僵蚕工厂化生产提供优良菌株。【方法】利用孢子稀释法从山西省养殖农户中自然感染白僵菌的家蚕中分离获得一株原始白僵菌,运用紫外-微波复合的方式对该菌株进行诱变,并比较诱变前后菌株的产孢量及对家蚕的致病力。【结果】分离得到的原始菌株经鉴定为球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*),命名为 *Beauveria bassiana* Bb1003。通过对致死率和正突变率的考察,确定紫外-微波复合诱变的最佳诱变条件为紫外(功率为 15 W)照射 30 min,微波(功率为 800 W、额定微波频率 2 450 MHz)辐照 60 s。筛选后得到 6 株复合诱变菌株(UMCM1、UMCM2、UMCM3、UMCM4、UMCM5 和 UMCM6)。菌株 UMCM2 对家蚕的僵化率高达 97.64%,产孢量是原始菌株的 2.48 倍,对家蚕的致病能力显著高于原始菌株。【结论】利用紫外-微波复合诱变的方式成功筛选到高毒力菌株,为工厂化生产白僵蚕奠定了基础。

关键词: 白僵蚕; 白僵菌; 紫外-微波复合诱变

资助项目: 晋中市科技重点研发计划(Y212009); 山西农业大学科技创新基金(Zdpy2019 04)

This work was supported by the Jinzhong Key Research and Development of Science and Technology Program (Y212009) and the Science and Technology Innovation Foundation for Shanxi Agricultural University (Zdpy2019 04).

*Corresponding author. E-mail: lwhsxau@sxau.edu.cn

Received: 2022-11-11; Accepted: 2023-03-26; Published online: 2023-05-11

Screening and compound mutagenesis of a highly pathogenic *Beauveria bassiana* strain infecting silkworm

LIU Chenhao¹, LI Weihong^{*1}, YANG Ning²

1 College of Resources and Environment, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030800, Shanxi, China

2 College of Food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030800, Shanxi, China

Abstract: [Background] The bioactive substances in batryticated silkworms (*Bombyx mori* larvae infected by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*) are widely used in medicine, healthcare, and cosmetic industries. At present, most of strains used in the production of batryticated silkworms are the spore powder from naturally dead batryticated silkworms without purification, and there is no fixed application concentration, which make it difficult to ensure the mortality of silkworms. It is an important direction in the research and development for industrial production of batryticated silkworm to improve the pathogenicity of *B. bassiana* strains and screen out highly pathogenic strains with excellent biological characteristics. [Objective] To screen out highly pathogenic strains by ultraviolet-microwave compound mutagenesis and provide elite strains for the factory production of batryticated silkworms. [Methods] A strain of *B. bassiana* was isolated with the spore dilution method from naturally infected domestic silkworms in Shanxi province. The strain was then mutagenized by UV-microwave combination, and the spore production and pathogenicity of the strain were compared before and after mutagenesis. [Results] The original strain obtained by isolation was identified as *B. bassiana* and named *B. bassiana* Bb1003. Considering the mortality and positive mutation rate, we optimized the mutagenesis conditions as UV (15 W) irradiation for 30 min combined with microwave (800 W, rated microwave frequency of 2 450 MHz) treatment for 60 s. Six mutated strains, including UMCM1, UMCM2, UMCM3, UMCM4, UMCM5, and UMCM6, were obtained after screening. UMCM2 caused an infection rate of 97.64% for silkworm, produced spores 2.48 times those of the original strain, and had significantly higher pathogenic capacity for silkworm than the original strain. [Conclusion] A highly pathogenic strain was produced by ultraviolet-microwave compound mutagenesis, which laid a foundation for the mass production of batryticated silkworms.

Keywords: batryticated silkworms; *Beauveria bassiana*; ultraviolet-microwave compound mutagenesis

球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)在分类学上属于丛梗孢科(*Moniliaceae*)白僵菌属(*Beauveria*)^[1], 是一种常见的昆虫病原真菌。球孢白僵菌能够侵染 700 多种昆虫, 在农林业生物防治领域具有广泛的应用^[2-3]。例如: 使用白僵菌侵染草地贪夜蛾幼虫可达到 100%的防治率^[4]; 采用白僵菌

喷粉法对思茅松毛虫的杀灭率为 79.84%^[5]; 田间防治对草原东亚飞蝗的致死率可达 88.9%^[6]。研究表明, 白僵菌具有丰富的遗传多样性^[7-8]和明显的专化性^[9-10], 因此农林上用于防治害虫的白僵菌不会引起家蚕白僵病的发生; 陈雪等^[11]通过对家蚕和松毛虫分离株进行 ISSR 分子标记

研究, 建立 UPGMA 系统发育树, 分析发现家蚕分离株和松毛虫分离株都属于球孢白僵菌, 但明显分为了两大类群, 进一步通过三维主坐标分析, 结果表明尚无松毛虫分离株混杂在家蚕分离株中, 也无家蚕分离株混杂在松毛虫分离株中, 说明松毛虫、家蚕病原白僵菌都具有寄主专化性, 也说明家蚕只会被来源于家蚕的病原白僵菌侵染。

球孢白僵菌侵染的家蚕幼虫干燥后称为白僵蚕或僵蚕, 具有极高的药用价值^[12]。球孢白僵菌的分生孢子在家蚕(*Bombyx mori*)体壁上附着及诱导萌发, 出芽并形成芽管, 利用机械压力和分泌的几丁质酶穿透家蚕体壁, 进入家蚕体内, 吸收家蚕体内的营养物质不断繁殖, 同时产生毒素, 直至家蚕僵化; 家蚕死后, 白僵菌从宿主内部生长至表皮外, 并在僵虫上产生分生孢子^[13-16]。僵蚕因其具有多种药理活性, 在治疗头痛、哮喘、糖尿病、白癜风等疾病方面具有广泛的应用^[17-18]。此外, 研发者对僵蚕的开发应用已经从传统的中药材扩展至保健品和化妆品等领域^[19-20]。

市场上的僵蚕主要来源于蚕农在养蚕过程中自然感染白僵病的僵蚕^[21]。受致病菌株、家蚕品种和环境的影响, 品质参差不齐^[22], 而且随着家蚕养殖技术的不断提高, 自然染病的白僵蚕越来越少。对优质白僵蚕的需求量逐年增加, 导致市场供不应求^[21]。因此, 寻找具有高致病力的菌株进行僵蚕的工厂化生产具有广阔的前景。

优良的白僵菌菌株是规模化人工生产僵蚕的前提条件, 在白僵蚕菌种筛选方面已有专家学者开展了相关研究。孙伟屹等^[23]从蚕区自然染病僵蚕上分离出了 5 株白僵菌菌株, 并对其营养生长量、产孢量及对家蚕的毒力进行了研究, 结果表明不同菌种对家蚕的致病力不同。

路国兵等^[24]对山东省主要蚕区筛选出的 9 株白僵菌进行了比较, 为白僵菌筛选技术方案的建立及工厂化生产提供了可靠的技术。陈静等^[25]从广西河池蚕区分离出一株白僵菌, 研究其对家蚕的致病力并对僵蚕成品品质进行了检测, 结果为提高白僵蚕的产量和品质奠定了试验基础。

白僵菌具有遗传多样性和毒力差异, 导致其品质差异较大, 选育具有高产孢量、毒力性强的优良菌株对僵蚕工厂化生产至关重要^[26-27]。自然筛选^[28-29]、人工诱变^[30-31]和基因工程^[32-33]等是选育高致病性白僵菌菌株的主要手段。研究人员利用紫外诱变白僵菌, 获得了具有较高毒力和稳定性的突变株, 其感染玉米螟^[34]、马尾松毛虫^[35]的毒力试验结果显示突变株致死率均显著高于原始菌株。本研究利用自然筛选法, 在感染白僵菌的家蚕虫体上分离获得一株白僵菌, 利用紫外诱变、微波诱变、紫外-微波复合诱变对其进行诱变选育。本研究旨在获得高毒力的白僵菌菌株, 以期为工厂化生产僵蚕作出有益的探索。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株、虫源

球孢白僵菌 Bb1003 菌株分离纯化自山西省晋城市阳城县次营镇桑蚕养殖农户自然感染白僵菌的家蚕虫体。

家蚕品种为秋丰 X 白玉, 幼虫常规环境条件下用新鲜桑叶饲喂至 5 龄起供试。

1.1.2 供试培养基

产孢培养基(g/L)^[36]: 蔗糖 15.0, 酵母粉 5.0, 蛋白胨 2.0, 玉米粉 2.5, 乳糖 3.0, 棉仁粉 1.0, 硼酸 0.1, 硫酸镁 1.0, 硫酸铜 0.05, 磷酸二氢钾 2.0, 硫酸锌 0.05, 硫酸亚铁 0.05, 硫酸锰 0.02, 琼脂 15.0。

1.1.3 主要试剂和仪器

Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒、dNTPs、SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; *Taq*TM DNA 多聚酶, MBI 公司; 琼脂糖, 生命科学有限公司。洁净工作台, 北京东联哈尔仪器制造有限公司; 恒温培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 光学显微镜, 奥林巴斯有限公司; PCR 扩增仪, Applied Biosystems 公司; 凝胶成像仪, 上海复日科技仪器有限公司; 紫外灯, 广东雪莱特光电科技股份有限公司。

1.2 菌株分离筛选

参照邓春生等^[36]的方法。在无菌条件下, 取部分白僵蚕虫体置于研钵中, 加入含 0.05% 吐温-80 的无菌水充分研磨配制成 10 mL 原液, 将菌悬液进行多梯度稀释(10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 和 10^{-9}), 取各级稀释液 100 μ L 涂布于产孢培养基上。在恒温培养箱中进行培养(温度 26 $^{\circ}$ C, 相对湿度 RH 75%)。待形成菌落后挑取单孢子, 转接至新培养基置于 26 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中进行培养, 目测和镜检确定平板上长出的菌落形态特征一致, 得到纯种菌体, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.3 菌株鉴定

1.3.1 形态观察

取 10 μ L 浓度为 1×10^{-7} 的孢悬液接种到产孢固体培养基中, 在 26 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中倒置培养, 观察记录菌株菌落形态特征, 并在光学显微镜下观察该菌株的产孢结构和分生孢子形态。

1.3.2 分子生物学鉴定

采用真菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取 DNA, 利用真菌通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGG TGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCT TATTGATATGC-3') 进行 ITS 序列的 PCR 扩增^[37]。PCR 反应体系(25 μ L): 10 \times buffer (Mg^{2+}) 2.5 μ L,

上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 1 μ L, DNA (50 ng/ μ L) 0.5 μ L, *Taq*TM DNA 多聚酶(5 U/ μ L) 0.2 μ L, ddH₂O 补足 25 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒纯化后送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将测序结果提交至 NCBI 基因数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov) 并进行 BLAST 比对分析, 采用 MEGA 6.0 软件中的 neighbor-joining (N-J) 法构建系统发育树^[38]。

1.4 孢子悬浮液制备

将分离纯化菌株接种于产孢培养基上在 26 $^{\circ}$ C 培养至其完全产孢, 然后刮下孢子加入含 0.05% 吐温-80 的无菌水中, 用磁力搅拌器将其搅拌均匀, 在显微镜下用血球计数板对孢子进行计数, 将其浓度分别配制成 1×10^9 、 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 和 1×10^5 个/mL 的孢子悬浮液, 保存在 4 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.5 分离菌株对家蚕幼虫的致病力测定

利用不同浓度的孢子悬浮液对家蚕 5 龄幼虫进行定量喷施处理, 饲喂足量桑叶, 每天喂食 3 次(培养条件为 26 $^{\circ}$ C, 相对湿度 RH 75%)。记录幼虫僵化数, 根据僵化率确定侵染的最佳浓度。每个处理 500 头幼虫。

1.6 菌株的诱变

1.6.1 紫外诱变

选用功率为 15 W 的紫外灯, 与培养皿垂直距离 28 cm。预热紫外灯 30 min, 待波长达到稳定状态时, 吸取 5 mL 菌悬液于直径 9 cm 的无菌培养皿中, 打开培养皿盖, 边搅拌边紫外处理, 照射时间分别为 5、10、20、30、40、50 和 60 min^[39-41]。将经过紫外线诱变处理的菌悬液适当稀释, 取 100 μ L 接种于产孢固体培养基上, 在 26 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中避光培养 5 d 后记

录菌落数量, 绘制菌株的致死率曲线。将突变菌株重新接种到新的产孢固体培养基上, 单菌落培养至完全产孢, 以等浓度未经诱变的菌株孢子悬浮液作为对照组计算产孢量, 以产孢量超过诱变前菌株 1 倍以上的突变菌株作为正向突变菌株。通过致死率及正突变率筛选出紫外诱变的最佳时间。致死率和正突变率计算方法为:

致死率(%)=(对照组菌落数-处理组菌落数)/对照组菌落数×100

正突变率(%)=正突变的菌株/总菌株个数×100

1.6.2 微波诱变

取制备好的悬液 5 mL 于无菌培养皿内, 选用功率 800 W、额定微波频率 2 450 MHz 的微波炉, 按照不同辐射时间(10、20、30、40、50、60、70、80、90 和 100 s)对孢子悬浮液进行辐射处理, 每辐射 10 s 后在冰上快速冷却 10 s 再辐射。

1.6.3 紫外-微波复合诱变

取 10 mL 制备好的浓度为 1×10^7 个/mL 孢子悬浮液于无菌培养皿内, 以紫外诱变和微波诱变所得最佳时间对菌悬浮液进行复合诱变。

1.7 数据统计分析

每组对应各指标均做 3 次平行试验。分别使用 Microsoft Excel 2019 和 SPSS 26.0 软件绘制相关图表并对试验结果进行统计分析。显著性分析采用 Duncan 多重比较法, 结果用平均值±标准差(SD)表示, $P < 0.05$ 表示显著性差异。

2 结果与分析

2.1 菌株形态特征及分子生物学鉴定结果

在固体培养基中, 分离菌株的菌落为白色, 边缘呈绒毛状, 中间凸起, 褶皱较多, 放射沟明显(图 1)。形态学特征符合《昆虫真菌学》^[2]中球孢白僵菌的特征, 将该菌株初步鉴定为球孢白僵菌。



图 1 单菌落的外观特征

Figure 1 Observation of single colony isolated in this study.

使用 PCR 扩增目的菌株的 ITS 序列片段, 测序结果显示扩增片段为 465 bp, GC 含量为 58%。将该菌株的 ITS 基因序列提交至 GenBank 并上传该序列(GenBank 登录号为 OP716165.1)至 NCBI 进行 BLAST 对比, 发现该菌株 ITS 序列与多个球孢白僵菌菌株高度一致, 与 *Beauveria bassiana* ARSEF 1564 (NR111594.1) 序列一致性为 99.79%。通过邻接法构建系统发育树(图 2)显示, 该菌株与球孢白僵菌聚为一簇。结合菌落、孢子等形态学特征和分子系统发育, 将该菌株确定为球孢白僵菌, 命名为 *Beauveria bassiana* Bb1003。

2.2 分离菌株对家蚕幼虫的致病力测定结果

用球孢白僵菌 Bb1003 不同浓度的孢子悬浮液对家蚕 5 龄幼虫进行处理。家蚕僵化率对不同浓度的响应有明显差异(图 3), 随着菌株浓度的增加其僵化率呈先增加后减少的趋势。当菌株浓度为 1×10^7 个/mL 时僵化率最高, 达到了 84.91%; 当菌株浓度超过 1×10^7 个/mL 时僵化率下降。因此其最佳施用菌株浓度为 1×10^7 个/mL。

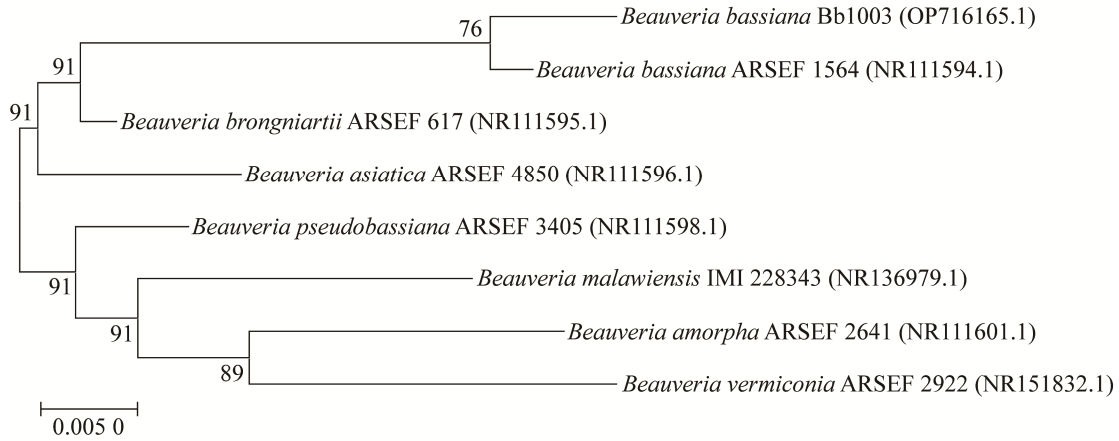


图2 基于 ITS 序列构建的系统发育树 括号中序号是相关菌株的 GenBank 登录号; 分支点上的数字是 bootstrap 支持率; 标尺刻度 0.005 0 是序列差异的分支长度

Figure 2 Phylogenetic tree based on ITS sequence. The numbers in parentheses are GenBank accession numbers of related strains; The numbers in each branch points are percentages supported by bootstrap; Bar=0.005 0 is nucleotide divergence.

2.3 紫外诱变时间对致死率和正突变率的影响

研究发现为确保菌体能够获得最大的正向突变, 一般将紫外致死率控制在 70%–80%^[42]。本研究对球孢白僵菌 Bb1003 进行紫外诱变处

理。结果发现, 紫外照射时间为 5–60 min 范围内, 致死率随时间增加而上升, 正突变率呈先上升后下降的趋势; 当紫外照射时间为 30 min 时, 球孢白僵菌 Bb1003 致死率为 85.34%, 此时正突变率达到最高, 为 18.73% (图 4)。因此, 选择 30 min 作为球孢白僵菌 Bb1003 的最佳紫外诱变时间。

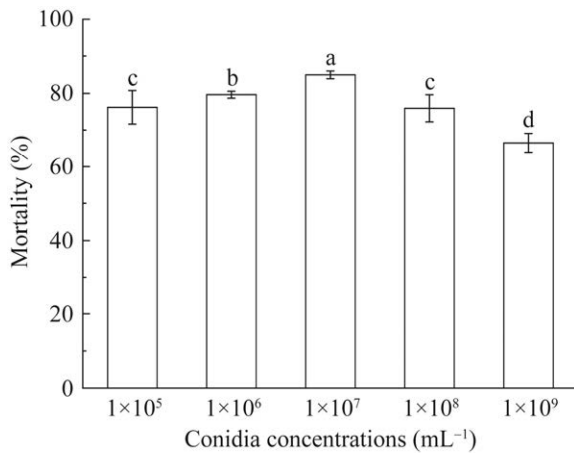


图3 球孢白僵菌 Bb1003 不同浓度的僵化死亡率 不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著

Figure 3 Mortality rate of various concentrations of *Beauveria bassiana* Bb1003. Different lowercase letters indicate significant difference at $P<0.05$ level.

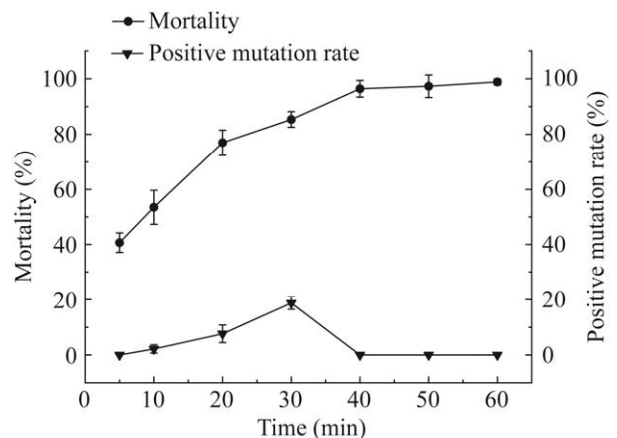


图4 紫外诱变时间对致死率和正突变率的影响 Figure 4 Effect of UV mutagenesis time on mortality and positive mutation rate.

2.4 微波诱变时间对致死率和正突变率的影响

研究发现, 时间是影响微波诱变效果的主要因素, 在诱变过程中存在最适时间, 当细胞存活率较高时, 突变率随着时间的增加而增大; 当超过最适时间后, 突变率反而下降^[41]。本研究对球孢白僵菌 Bb1003 微波诱变 10–100 s, 以确定微波诱变的最佳时间。结果显示, 随着微波照射时间的增加, 致死率逐渐上升, 100 s 时致死率达到 98.14%, 正突变率呈先上升后下降的趋势; 当微波照射时间为 60 s 时, 球孢白僵菌 Bb1003 致死率为 88.85%, 此时正突变率达到最高, 为 17.15% (图 5)。因此, 选择 60 s 作为球孢白僵菌 Bb1003 的最佳微波诱变时间。

2.5 复合诱变菌株对家蚕幼虫的致病力

紫外-微波复合诱变对球孢白僵菌 Bb1003 菌株产孢量具有一定的影响, 以诱变前菌株作为对照, 紫外-微波复合诱变所得正突变率为 24.64%, 筛选出的 6 株正突变菌株中, UMCM2 产孢量最高, 为 15.19×10^7 个/mL。将筛选出的 6 株正突变菌株稀释成 1×10^7 个/mL 孢子悬浮液, 以诱变之前菌株(球孢白僵菌 Bb1003)作为对照, 对家蚕 5 龄幼虫进行侵染, 记录其僵化

率。结果表明筛选出的 6 株正向突变菌株僵化率均高于对照组, 其中菌株 UMCM2 僵化率最高, 为 97.64% (表 1)。

3 讨论与结论

在传统真菌分类方法中, 形态学特征是真菌分类的重要依据^[43]。随着分子生物学及其相关学科的发展, ITS 序列分析成为目前真菌分类鉴定最常用的分子生物学方法^[44]。本研究通过形态学观察初步判定从自然染病的家蚕中分离纯化出的菌株为球孢白僵菌。基于菌株 ITS 的系统发育分析, 该分离菌株与数据库中的球孢白僵菌聚为一支, 结合以上分析, 确认该菌株属于白僵菌属球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*), 并命名为 *Beauveria bassiana* Bb1003。

本研究对家蚕接种不同浓度的菌液(1×10^9 、 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 和 1×10^5 个/mL), 结果表明, *Beauveria bassiana* Bb1003 菌株对家蚕具有致病力, 白僵菌孢子浓度对家蚕的僵化率影响很大, 当接种浓度低于一定值时, 接种浓度越

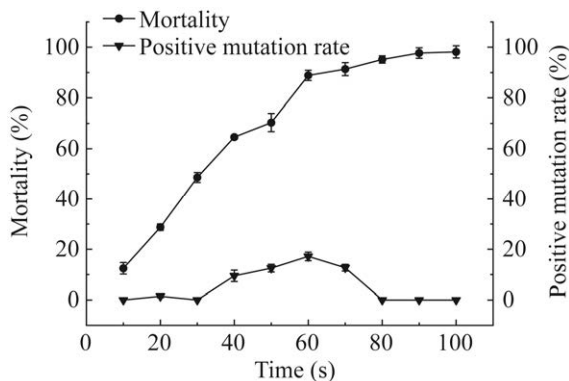


图 5 微波诱变时间对致死率和正突变率的影响
Figure 5 Effect of microwave mutagenesis time on mortality and positive mutation rate.

表 1 复合诱变 6 株突变菌株的产孢量及其对家蚕的致病力

Table 1 Conidial production of six mutant strains by compound mutagenesis and their pathogenicities to silkworm

菌株	产孢量	僵化率
Strain	Conidial production ($\times 10^7$ /mL)	Mortality (%)
CK	6.12±0.98d	85.17±1.22d
UMCM1	13.38±0.87bc	90.36±1.37bc
UMCM2	15.19±1.14a	97.64±1.03a
UMCM3	14.26±0.95ab	91.42±0.69b
UMCM4	13.06±0.60c	95.67±0.92a
UMCM5	13.95±1.32bc	89.28±0.89c
UMCM6	13.56±0.77bc	91.74±0.88b

同列数据后不同小写字母表示 0.05 水平上存在显著差异
Date with different lowercase letters in the same column indicated significantly different at 0.05 level.

低其僵化率就越低,这与李文学等^[45]的研究结果一致。本研究中,随着接种浓度的增加,家蚕的僵化率先升高后降低,浓度过高时家蚕会出现蚕体发黑而死亡的现象,使得家蚕的僵化率降低,这与李文学等^[45]的研究结果有些差别。本研究中蚕体出现发黑而死亡的原因有待进一步研究。

研究发现从自然染病的家蚕中分离出的球孢白僵菌 Bb1003 对家蚕致病性较低,为进一步提高菌株对家蚕的致病力,我们采用物理诱变手段对原始菌株进行了选育和优化。前人研究发现,通过紫外线照射对白僵菌进行诱变可以提高菌株的毒力^[35]。本研究综合考虑单一因素诱变正向突变率低、遗传不稳定、工作量大等缺点^[46]。在前人研究基础上对筛选出的白僵菌菌株进行了紫外-微波复合诱变,最终得到的菌株产孢量是出发菌株的 2.48 倍,对家蚕的致病能力也显著高于出发菌株。本研究中单一紫外诱变及单一微波诱变最大正向突变率分别为 18.73% 和 17.15%,复合诱变正向突变率为 24.64%,说明复合诱变与单一诱变相比可以获得更高的正向突变率;与只进行单一紫外诱变相比本研究所采用的复合诱变得得到目的菌株的概率要大,并能在短时间内筛选出目的菌株^[47]。

本研究首次对家蚕致病菌进行了复合诱变,筛选出了高毒力菌株并进行了室内试验,但缺少大规模的田间试验,我们拟进行田间测试以确认该菌株在实际生产中的毒力。此外,保证球孢白僵菌孢子萌发率、毒力是侵染家蚕的前提^[48],因此合理保存球孢白僵菌、开发白僵菌新型制剂是接下来的研究重点。

REFERENCES

- [1] MACLEOD DM. Investigations on the genera *Beauveria* Vuill, and *tritirachium* limber[J]. Canadian Journal of Botany, 1954, 32(6): 818-890.
- [2] 蒲蛰龙,李增智.昆虫真菌学[M].合肥:安徽科学技术出版社,1996.
PU ZL, LI ZZ. Insect Mycology[M]. Hefei: Anhui Science & Technology Publishing House, 1996 (in Chinese).
- [3] SHAH PA, PELL JK. Entomopathogenic fungi as biological control agents[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 61(5): 413-423.
- [4] 陈自宏,张鸭关,徐玲,何馨成.滇西白僵菌对草地贪夜蛾的毒力及其农田消长动态[J].云南农业大学学报(自然科学版),2022,37(1): 69-74.
CHEN ZH, ZHANG YG, XU L, HE QC. Virulence of *Beauveria* to *Spodoptera frugiperda* in Western Yunnan and its dynamics in fields[J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science Edition), 2022, 37(1): 69-74 (in Chinese).
- [5] 冯玉元.白僵菌防治思茅松毛虫研究[J].林业科技,2018,43(4): 26-29.
FENG YY. Study on the control of *Dendrolimus kikuchii* by *Beauveria bassiana*[J]. Forestry Science & Technology, 2018, 43(4): 26-29 (in Chinese).
- [6] 刘海洋,刘龙,刘新宇,王敦.两株杀虫真菌对陕西榆林草原蝗虫的防治效果[J].中国生物防治学报,2021,37(2): 380-384.
LIU HY, LIU L, LIU XY, WANG D. The control efficacy of two fungal strains against locusts of grassland in Yulin, Shaanxi[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2021, 37(2): 380-384 (in Chinese).
- [7] 丁德贵,李增智,樊美珍,王滨.球孢白僵菌种群在松林中的寄主转移及遗传多样性对松毛虫持续控制的影响[J].应用生态学报,2004,15(12): 2315-2320.
DING DG, LI ZZ, FAN MZ, WANG B. Host transfer of *Beauveria bassiana* population in pine stand ecosystem and impact of its genetic diversity on sustainable control of Masson's pine caterpillars[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2004, 15(12): 2315-2320 (in Chinese).
- [8] WANG SB, MIAO XX, ZHAO WG, HUANG B, FANG MZ, LI ZZ, HUANG YP. Genetic diversity and population structure among strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR)[J]. Mycological Research, 2005, 109(12): 1364-1372.
- [9] WANG CS, SHAH FA, PATEL N, LI ZZ, BUTT TM. Molecular investigation on strain genetic relatedness and population structure of *Beauveria bassiana*[J]. Environmental Microbiology, 2003, 5(10): 908-915.
- [10] ZIMMERMANN G. Review on safety of the

- entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*[J]. *Biocontrol Science and Technology*, 2007, 17(6): 553-596.
- [11] CHEN X, HUANG C, HE LM, ZHANG SL, LI ZZ. Molecular tracing of white muscardine in the silkworm, *Bombyx mori* (Linn.) II. Silkworm white muscardine is not caused by artificial release or natural epizootic of *Beauveria bassiana* in China[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2015, 125: 16-22.
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典—一部: 2015年版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015. Chinese Pharmacopoeia Commission. People's Republic of China (PRC) Pharmacopoeia-Part I: 2015 Edition[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015 (in Chinese).
- [13] CLARKSON JM, CHARNLEY AK. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects[J]. *Trends in Microbiology*, 1996, 4(5): 197-203.
- [14] ORTIZ-URQUIZA A, KEYHANI NO. Molecular genetics of *Beauveria bassiana* infection of insects[J]. *Advances in Genetics*, 2016, 94: 165-249.
- [15] 田志来, 阮长春, 李启云, 谭云峰, 孙光芝. 球孢白僵菌对昆虫致病机理的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(36): 16000-16002. TIAN ZL, RUAN CC, LI QY, TAN YF, SUN GZ. Advances in studies on the pathogenic mechanism of *Beauveria bassiana* to insects[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2008, 36(36): 16000-16002 (in Chinese).
- [16] MASUDA T. Microbial control of the diamondback moth, *Plutella xylostella*, by an entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. II. effects of temperature on mycoses and conidial invasion time[J]. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*, 2000, 44(3): 177-182.
- [17] 莫雪林, 胡美变, 肖禾, 吴纯洁, 张俊侠. 僵蚕的本草考证[J]. *中药与临床*, 2016, 7(5): 47-50. MO XL, HU MB, XIAO H, WU CJ, ZHANG JX. Textual research of Jiangcan[J]. *Pharmacy and Clinics of Chinese Materia Medica*, 2016, 7(5): 47-50 (in Chinese).
- [18] HU MB, YU ZJ, WANG JL, FAN WX, LIU YJ, LI JH, XIAO H, LI YC, PENG W, WU CJ. Traditional uses, origins, chemistry and pharmacology of *Bombyx batryticatus*: a review[J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2017, 22(10): 1779.
- [19] 米红霞, 刘吉平. 白僵蚕应用研究进展[J]. *广东蚕业*, 2010, 44(1): 46-48. MI HX, LIU JP. Research progress on application of *Bombyx Batryticatus*[J]. *Guangdong Sericulture*, 2010, 44(1): 46-48 (in Chinese).
- [20] 李晓鸿. 中药僵蚕在化妆品应用中的功效初探[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2020. LI XH. Preliminary study on the efficiency of *Bombyx batryticatus* in cosmetics application[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2020 (in Chinese).
- [21] 李娜, 李季生, 贾漫丽, 黄露, 刘沿延, 杨贵明. 冀东地区僵蚕专业化生产的可行性分析[J]. *北方蚕业*, 2016, 37(4): 55-58. LI N, LI JS, JIA ML, HUANG L, LIU YY, YANG GM. Feasibility analysis of specialized production of *Bombyx Batryticatus* in eastern Hebei Province[J]. *North Sericulture*, 2016, 37(4): 55-58 (in Chinese).
- [22] 胡文娟, 罗梅兰, 唐亮. 工厂化生产白僵蚕的前景、存在问题与发展对策[J]. *广东蚕业*, 2017, 51(4): 7-9. HU WJ, LUO ML, TANG L. Prospect of industrialized production of *Bombyx Batryticatus*; Problems and development countermeasures[J]. *Guangdong Sericulture*, 2017, 51(4): 7-9 (in Chinese).
- [23] 孙伟屹, 张磊, 鲍先巡, 林华峰. 对家蚕高毒力白僵菌菌株的筛选[J]. *安徽农业大学学报*, 2008, 35(3): 449-451. SUN WY, ZHANG L, BAO XX, LIN HF. Isolation of *Beauveria bassiana* of high virulent strains against *Bombyx mori* L.[J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2008, 35(3): 449-451 (in Chinese).
- [24] 路国兵, 王更先, 韩景瑞, 牟志美. 白僵菌菌株的分离鉴定及生物学特性研究[J]. *中国蚕业*, 2007, 28(2): 13-15, 32. LU GB, WANG GX, HAN JR, MU ZM. Isolation, identification and biological characteristics of *Beauveria bassiana* strain[J]. *China Sericulture*, 2007, 28(2): 13-15, 32 (in Chinese).
- [25] 陈静, 赖晓芳, 彭洁怡, 王焕宇, 孙施乐. 一株家蚕病原白僵菌的鉴定及人工生产白僵蚕初探[J]. *蚕业科学*, 2020, 46(2): 178-183. CHEN J, LAI XF, PENG JY, WANG HY, SUN SL. Identification of a pathogenic *Beauveria bassiana* strain from *Bombyx mori* and preliminary study on artificial production of *Bombyx batryticatus*[J]. *Science of Sericulture*, 2020, 46(2): 178-183 (in Chinese).
- [26] 邢东旭, 李丽, 廖森泰, 肖阳, 李庆荣, 叶明强, 杨琼. 一株感染家蚕的高致病性白僵菌的鉴定及在僵蚕生产中的应用[J]. *蚕业科学*, 2014, 40(5): 879-883. XING DX, LI L, LIAO ST, XIAO Y, LI QR, YE MQ,

- YANG Q. Identification of a *Beauveria bassiana* strain with high pathogenicity to *Bombyx mori* and its application in *Bombyx batryticatus* production[J]. Science of Sericulture, 2014, 40(5): 879-883 (in Chinese).
- [27] 米红霞, 刘吉平. 白僵菌生防菌株 Bb10 和 4 株家蚕来源白僵菌分离株的生物学特性研究[J]. 蚕业科学, 2010, 36(6): 962-967.
- MI HX, LIU JP. Studies on the biological characteristics of *Beauveria bassiana* Bb10 from biocontrol agents and 4 *Beauveria bassiana* isolates of silkworm origin[J]. Science of Sericulture, 2010, 36(6): 962-967 (in Chinese).
- [28] 邹东霞, 廖旺较, 朱英芝, 吴耀军. 我国高毒力白僵菌菌株选育的研究进展[J]. 广西林业科学, 2013, 42(3): 263-266.
- ZOU DX, LIAO WJ, ZHU YZ, WU YJ. Research progress on high-virulence strain breeding of *Beauveria bassiana* in China[J]. Guangxi Forestry Science, 2013, 42(3): 263-266 (in Chinese).
- [29] 林庆源. 木毒蛾白僵菌优良菌株的自然筛选及应用研究[J]. 武夷科学, 2000, 16: 211-215.
- LIN QY. The natural selection of the excellent *Beauveria bassiana* strains of *lymantria xylyna* swinhoe and practical application[J]. Wuyi Science Journal, 2000, 16: 211-215 (in Chinese).
- [30] MFUTI DK, SUBRAMANIAN S, van TOL RW, WIEGERS GL, de KOGEL WJ, NIASSY S, du PLESSIS H, EKESI S, MANIANIA NK. Spatial separation of semiochemical Lurem-TR and entomopathogenic fungi to enhance their compatibility and infectivity in an autoinoculation system for thrips management[J]. Pest Management Science, 2016, 72(1): 131-139.
- [31] THOMPSON SR, BRANDENBURG RL, ARENDS JJ. Impact of moisture and UV degradation on *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin conidial viability in turfgrass[J]. Biological Control, 2006, 39(3): 401-407.
- [32] SHANG YF, DUAN ZB, HUANG W, GAO Q, WANG CS. Improving UV resistance and virulence of *Beauveria bassiana* by genetic engineering with an exogenous tyrosinase gene[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2012, 109(1): 105-109.
- [33] 阙生全, 喻爱林, 刘亚军, 涂叶苟, 王小东, 熊彩云. 白僵菌应用研究进展[J]. 中国森林病虫, 2019, 38(2): 29-35.
- QUE SQ, YU AL, LIU YJ, TU YG, WANG XD, XIONG CY. Application research progress of *Beauveria*[J]. Forest Pest and Disease, 2019, 38(2): 29-35 (in Chinese).
- [34] 田志来, 孙光芝, 温嘉伟, 闫守荣, 赵艳芹, 谭云峰. 玉米螟高毒力白僵菌菌株紫外线诱变选育[J]. 玉米科学, 2011, 19(4): 128-130.
- TIAN ZL, SUN GZ, WEN JW, YAN SR, ZHAO YQ, TAN YF. Ultraviolet ray mutation breeding for high toxicity strains of *Beauveria bassiana* against *Ostrinia nubilacis*[J]. Journal of Maize Sciences, 2011, 19(4): 128-130 (in Chinese).
- [35] 靳磊, 贺月林, 刘红, 王震. 紫外诱变选育球孢白僵菌高产菌株[J]. 湖南农业科学, 2011(11): 30-31, 35.
- JIN L, HE YL, LIU H, WANG Z. Selection of high-yield strain for *Beauveria bassiana* by UV mutagenesis[J]. Hunan Agricultural Sciences, 2011(11): 30-31, 35 (in Chinese).
- [36] 邓春生, 张燕荣, 张曼曼, 耿兵, 吴伟, 付文君, 张冬梅. 球孢白僵菌可湿性粉剂对马铃薯甲虫的防治效果[J]. 中国生物防治学报, 2012, 28(1): 62-66.
- DENG CS, ZHANG YR, ZHANG MM, GENG B, WU W, FU WJ, ZHANG DM. Effect of *Beauveria bassiana* wettable powder against *Leptinotarsa decemlineata* (say)[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2012, 28(1): 62-66 (in Chinese).
- [37] 潘力, 崔翠, 王斌. 一种用于 PCR 扩增的丝状真菌 DNA 快速提取方法[J]. 微生物学通报, 2010, 37(3): 450-453.
- PAN L, CUI C, WANG B. Rapid extraction of filamentous fungal DNA for PCR amplification[J]. Microbiology China, 2010, 37(3): 450-453 (in Chinese).
- [38] KUMAR S, TAMURA K, NEI M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5(2): 150-163.
- [39] IKEHATA H, ONO T. The mechanisms of UV mutagenesis[J]. Journal of Radiation Research, 2011, 52(2): 115-125.
- [40] KANAKDANDE AP, KHOBRADE CN, MANE RS. Ultraviolet induced random mutagenesis in *Bacillus amyloliquefaciens* (MF 510169) for improving biodiesel production[J]. Fuel, 2021, 304: 121380.
- [41] SONGNAKA N, LERTCANAWANICHAKUL M, ATIPAIRIN A. Promising anti-MRSA activity of *Brevibacillus* sp. isolated from soil and strain improvement by UV mutagenesis[J]. Scientia Pharmaceutica, 2020, 89(1): 1.
- [42] 夏钱华, 尤朝阳, 张攀, 张路广, 许学峰, 汤云春. 微波和紫外诱变选育高效石油烃降解菌株[J]. 水处

- 理技术, 2017, 43(4): 36-41.
- XIA QH, YOU ZY, ZHANG P, ZHANG LG, XU XF, TANG YC. Microwave UV compound mutation breeding of efficient petroleum hydrocarbon degrading strains[J]. *Technology of Water Treatment*, 2017, 43(4): 36-41 (in Chinese).
- [43] 郭东升, 翟颖妍, 任广伟, 成巨龙, 刘云, 安德荣. 白僵菌属分类研究进展[J]. *西北农业学报*, 2019, 28(4): 497-509.
- GUO DS, ZHAI YY, REN GW, CHENG JL, LIU Y, AN DR. Advance of classification of genus *Beauveria*[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2019, 28(4): 497-509 (in Chinese).
- [44] 吴清平, 黄龙花, 杨小兵, 曾纪瑶, 李建辉. 核酸序列分析在真菌分类鉴定中的应用[J]. *中国卫生检验杂志*, 2009, 19(4): 959-961.
- WU QP, HUANG LH, YANG XB, ZENG JY, LI JH. Application of nucleic acid sequence analysis in fungi classification and identification[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2009, 19(4): 959-961 (in Chinese).
- [45] 李文学, 青学刚, 陈宝瑞, 肖文福, 邹邦兴, 刘俊凤. 家蚕致病性白僵菌的分离鉴定及其在僵蚕人工饲养中的应用[J]. *贵州农业科学*, 2019, 47(3): 93-95.
- LI WX, QING XG, CHEN BR, XIAO WF, ZOU BX, LIU JF. Identification of a pathogenesis *Beauveria bassiana* strain isolated from *Bombyx mori* and its application in artificial feeding of *Bombyx batryticatus*[J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2019, 47(3): 93-95 (in Chinese).
- [46] 郭建强, 柴秀娟, 庞学兵, 裴娟, 王爱英. 芽胞杆菌高产纤维素酶菌株的诱变选育与培养基优化[J]. *核农学报*, 2017, 31(2): 263-270.
- GUO JQ, CHAI XJ, PANG XB, PEI J, WANG AY. Mutation breeding and medium optimization of *Bacillus* sp. with high cellulase yielding[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2017, 31(2): 263-270 (in Chinese).
- [47] 梁亮, 邱雁临, 许进涛. 紫外线与亚硝酸钠复合诱变选育 L-组氨酸产生菌[J]. *微生物学杂志*, 2008, 28(2): 27-29.
- LIANG L, QIU YL, XU JT. Breeding of L-histidine producing bacterium by composite mutation with UV and NaNO₂[J]. *Journal of Microbiology*, 2008, 28(2): 27-29 (in Chinese).
- [48] 杨苗, 李英, 郭建刚, 任海潮, 许子怡, 李会平. 球孢白僵菌 Bb09 侵染美国白蛾的扫描电镜观察及其致病性[J]. *林业与生态科学*, 2022, 37(1): 30-39.
- YANG M, LI Y, GUO JG, REN HC, XU ZY, LI HP. Scanning electronic microscope and pathogenicity of *Beauveria bassiana* Bb09 infecting *Hyphantria cunea*[J]. *Forestry and Ecological Sciences*, 2022, 37(1): 30-39 (in Chinese).