

一株对桃蚜有高致病性球孢白僵菌的分离、筛选与鉴定

田 佳¹ 汝冰璐¹ 王 颖¹ 成巨龙² 李晓宇¹ 安德荣^{1*}

(1. 西北农林科技大学植物保护学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 陕西省烟草公司烟草研究所, 西安 710068)

摘要: 为筛选出对桃蚜 *Myzus persicae* 具有高致病性的生防真菌, 以从陕西省秦岭原始森林采集到的鳞翅目僵虫虫体中分离获得的5株真菌为研究对象, 测定其对桃蚜的致病性并筛选出高致病性菌株表现最佳杀蚜活性时的孢子悬浮液浓度, 同时结合形态学及18S rDNA和ITS-rDNA序列分析对致病性最高的病原菌进行鉴定。结果显示, 从5株菌株中初步筛选出1株高致病性菌株BQ-63, 处理7 d后桃蚜的死亡率为80.33%, 校正死亡率为81.58%, 僵虫率也达到最高, 为80.78%; 当菌株BQ-63的孢子浓度为 10^8 个/mL时, 对桃蚜的致病性达到最高, 处理7 d后死亡率为89.53%, 校正死亡率为90.10%, 僵虫率为89.84%; 通过形态学和分子生物学鉴定, 确定菌株BQ-63为球孢白僵菌 *Beauveria bassiana*。表明菌株BQ-63对桃蚜具有高致病性, 可作为生防真菌进行进一步的研究。

关键词: 球孢白僵菌; 桃蚜; 形态学; 分子生物学; 鉴定

Separation, screening and identification of one isolate of *Beauveria bassiana* with high pathogenicity to *Myzus persicae*

Tian Jia¹ Ru Binglu¹ Wang Ying¹ Cheng Julong² Li Xiaoyu¹ An Derong^{1*}

(1. College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China;

2. Tobacco Company of Shaanxi Province, Xi'an 710068, Shaanxi Province, China)

Abstract: In order to select highly pathogenic biocontrol strains for *Myzus persicae* (Sulzer), five fungal isolates were isolated from Lepidoptera muscardine cadavers in the primeval forests of Qinling in Shaanxi Province. Based on pathogenicity test, the most highly pathogenic biocontrol strain and its optimal concentration of spore were screened out. Morphological characteristics and molecular identification of the partial sequences of 18S rDNA and ITS-rDNA were used. The results showed that the best strain, BQ-63, was obtained from the five isolates. After seven-day-treatment, the mortality rate of *M. persicae* was 80.33%; the corrected mortality was 81.58% and the rate of corpse was 80.78%. Under different spore concentrations of BQ-63, the pathogenicity against *M. persicae* was measured, and the results showed that the best spore concentration was 10^8 /mL, with a mortality rate, corrected mortality and the rate of corpse of 89.53%, 90.10% and 89.84%, respectively. The strain BQ-63 was identified as *Beauveria bassiana* by using morphological and molecular methods. The results indicated that strain BQ-63 was highly virulent to *M. persicae* and could be used as a biocontrol fungus for further research.

Key words: *Beauveria bassiana*; *Myzus persicae*; morphology; molecular biology; identification

桃蚜 *Myzus persicae* (Sulzer) 是一种危害严重的农林业害虫, 不仅刺吸为害植物, 还可分泌蜜露造

成煤污病, 同时也是多种植物病毒的媒介昆虫, 其特点为繁殖快、世代重叠为害、寄主范围极广, 涉及50个

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(K312021301), 陕西省省科委科研专项(K332021006), 农业部农业行业专项(nyhyzx07-051)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: anderson323@163.com

收稿日期: 2016-11-06

科400余种植物(Weber, 1985)。由于化学药剂的长期使用,导致桃蚜的抗药性问题突出,因而桃蚜的生物防治逐渐成为科学工作者们的重要研究内容(高希武等, 1992; 陈年春和罗记台, 1994; 顾春波等, 2006)。目前,桃蚜的生物防治主要包括天敌防治和微生物防治,天敌包括捕食性天敌和寄生性天敌,捕食性天敌主要有七星瓢虫 *Coccinella septempunctata* L.、异色瓢虫 *Harmonia axyridis* (Pallas)、大草蛉 *Chrysopa pallens* (Rambur)、东亚小花蝽 *Orius sauteri* (Poppius)、黑带食蚜蝇 *Episyrphus balteatus* (De Geer)等,寄生性天敌包括蚜茧蜂和蚜小蜂2类(李姝等, 2014; 王圣印等, 2016)。我国桃蚜天敌种类很多,但天敌的释放与防治易受气候条件和人为因素等影响,仍有待进一步研究与解决。自然界中,杀蚜微生物种类繁多,包括真菌、细菌、放线菌等,其中杀蚜真菌能够直接侵染蚜虫体壁,在防治刺吸式害虫方面具有独特的优势(王利军等, 2010)。

杀蚜真菌可以寄生于昆虫的体表及体内,广泛应用于农林害虫的生物防治(林华峰, 1998; 王记祥和马良进, 2009)。很多国内外学者都对杀蚜真菌进行了广泛而深入的研究,成果颇丰。如Poprawski et al. (1999)研究表明白僵菌 *Beauveria* spp.、拟青霉 *Paecilomyces fumosoroseus* 和绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 等虫生真菌都对蚜虫具有一定的侵染活性; Nicolai & Eilenberg (2007)研究发现很多虫生真菌如球孢白僵菌 *B. bassiana* 和绿僵菌都可用于防治蚜虫等多种农业害虫,对维持温带地区农业生态系统的多样性具有重要意义; Kim et al. (2005)发现蜡蚧轮枝菌 *Verticillium lecanii* 与粗脊蚜茧蜂 *Aphidius colemani* 结合使用可提高其对棉蚜 *Aphis gossypii* 的防治效果。球孢白僵菌是研究应用最为广泛的广谱性昆虫病原性真菌之一,属于半知菌亚门丝孢纲丛梗孢目丛梗孢科白僵菌属。该菌在全球范围均有分布,寄生能力强且范围广,可侵染15目149科的700余种昆虫和6科的10多种蜚蠊类害虫,且对人畜无害,因而已被广泛开发并应用于有害生物防治(徐庆丰, 1991; 李正跃和张青文, 2005; 李增智等, 2011)。目前,我国关于白僵菌的研究与应用已达世界先进水平,白僵菌产量达全球第一,已成功应用于大面积防治农林害虫,如玉米螟、大豆食心虫 *Leguminivora glycinivorella* (Matsumura)、松毛虫等,特别是利用球孢白僵菌对松毛虫进行防治取得了巨大成功(李增智和樊美珍, 2000; 余素红等, 2009)。

本课题组从陕西省秦岭深山原始森林土壤中僵

死昆虫体内分离纯化获得5株生防真菌,为了获得具有更高杀蚜活性的生防真菌,本研究通过致病性测定从中筛选出对桃蚜有高致病性的生防真菌,确定其最佳杀蚜活性的孢子悬浮液浓度,并在形态学鉴定的基础上,对菌株18S rDNA和ITS-rDNA序列进行分析,使鉴定结果更为科学准确,以期寻求对桃蚜更加安全高效的生物防治方法提供研究材料。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株及虫源:供试菌株从陕西省秦岭深山原始森林土壤中僵死鳞翅目昆虫体内分离获得,僵虫样品采集于2015年6月。桃蚜取自西北农林科技大学植物保护学院实验基地温室中未施药的小白菜田,品种为金早生F1(陕西秦兴种苗有限公司),从小白菜田采集新鲜无污染的小白菜叶片带回实验室中用于桃蚜的饲养繁殖,饲养条件为 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、L:D=12 h:12 h、相对湿度65%。取最后一次蜕皮完成2 d内的无翅胎生成蚜作为试验虫体。

试剂: Ezup柱式真菌基因组DNA抽提试剂盒SK8259、dNTP、SanPrep柱式DNA回收试剂盒和引物NS1/NS6和ITS1/ITS4,生工生物工程(上海)股份有限公司; DreamTaq™ DNA Polymerase, 上海宝英生物科技有限公司; 琼脂糖, 美国BBI公司; 硫酸四环素及硫酸卡那霉素, 北京索莱宝科技有限公司。

培养基及仪器: 马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基: 马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂20 g, 加蒸馏水定容至1 L。3730XL测序仪、2720 Thermal Cycler PCR仪, 美国ABI公司; DYCP-31DN DNA电泳槽、DYY-5稳压电泳仪, 北京六一仪器厂; FR980凝胶成像仪, 上海复日科技仪器有限公司; SPX-250B-D恒温培养箱, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; CX31正置生物显微镜, 日本奥林巴斯公司; S-3400N扫描电子显微镜, 日本日立公司; YM253-267血球计数板, 上海远慕生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离与纯化

将采集的僵虫用消毒接种针挑取虫体上的霉层,接种于含2.5%硫酸四环素和2.5%硫酸卡那霉素的PDA平板上,每个平板接种3处(陈立杰等, 2008; 何劲等, 2009)。将表面无明显霉层或污染严重的虫体浸入75%的酒精5 s进行表面消毒,用灭菌的剪刀和镊子将其粉碎,并用无菌水稀释至适当浓度,涂布于含2.5%硫酸四环素和2.5%硫酸卡那霉

素的PDA平板上,恒温培养箱中26℃黑暗培养。待出现菌落后,对不同菌落进行单孢分离纯化。将分离到的纯化菌株接种至试管斜面,编号保存于西北农林科技大学资源微生物和植物病毒实验室,备用。

1.2.2 菌株对桃蚜致病性的测定

利用上述供试桃蚜对分离纯化所得菌株进行初步筛选。将纯化菌株分别接种于PDA平板,26℃条件下培养15 d,刮取各菌株菌落于含0.2%吐温-80的无菌水中,并用灭菌滤纸进行过滤,通过血球计数板计算,配制浓度为 10^6 个/mL的孢子悬浮液。采用喷雾法进行喷雾处理,用灭菌滤纸将处理后蚜虫体表多余孢子悬浮液吸干,于26℃、相对湿度85%条件下培养7 d,观察桃蚜的死亡情况(李银平等,2013;孟豪等,2014)。每个菌株为1个处理,每个处理3次重复,每重复桃蚜数量为50头。以含0.2%吐温-80的无菌水为对照,记录统计数据,并于相对湿度大于90%的条件下对虫尸保湿培养,观察其是否变为僵虫(魏萍等,2013)。根据记录统计的数据,计算死亡率、校正死亡率及僵蚜率,死亡率=死亡虫数/处理总虫数 $\times 100\%$;校正死亡率=(处理组死亡率-对照组死亡率)/(1-对照死亡率) $\times 100\%$;僵虫率=处理组僵虫数/处理组死亡虫数 $\times 100\%$ 。

1.2.3 高致病性菌株的最适杀蚜浓度筛选

将1.2.2中筛选出的对桃蚜具有高致病性的菌株分别配制成浓度为 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 个/mL的孢子悬浮液,进行最适浓度的筛选,孢悬液制备及对桃蚜的致病性测定方法同1.2.2。

1.2.4 高致病性菌株的形态学鉴定

将1.2.2中筛选的对桃蚜具有高致病性的菌株接种于PDA平板,26℃下培养15 d。每日定时测量并记录菌落直径,分析其生长状况。培养至15 d时,刮取全部菌落至20 mL含0.2%吐温-80的无菌水中,充分振荡15 min,制成孢子悬浮液并稀释,用血球计数板计数,重复3次,换算得到高致病性菌株每皿的产孢量。定期观察菌落形态特征及菌落正反两面的颜色,并使用光学显微镜和扫描电镜分别对菌株形态进行观察,以《昆虫真菌学》的检索表为依据对菌株进行形态学鉴定(蒲蛰龙和李增智,1996)。

1.2.5 高致病性菌株的分子生物学鉴定

本研究采用18S rDNA与ITS序列分析方法对菌株进行分子生物学鉴定。使用Ezup柱式真菌基因组DNA抽提试剂盒(SK8259)提取高致病性菌株的总DNA,参照王冰(2014)的方法。18S rDNA鉴定选用引物NS1(5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3')/

NS6(5'-GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC-3'),ITS序列鉴定选用引物ITS1(5'-TCCGTAGGTGAA-CCTGCGG-3')/ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATA-TGC-3'),分别进行PCR扩增和测序。25 μ L PCR反应体系:模板0.5 μ L、上下游引物各0.5 μ L、10 $\times$ Buffer(with Mg^{2+})2.5 μ L、10 mmol/L dNTP 1 μ L、酶0.2 μ L,补充去离子水至25 μ L。反应条件:94℃预变性4 min;94℃变性45 s,55℃退火45 s,72℃延伸1 min,30个循环;72℃延伸10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将测序所得序列在NCBI数据库进行BLAST比对,并下载相关菌种的相应序列,用Mega 5.1软件进行同源性分析,基于邻接法构建系统发育树。

1.3 数据分析

采用Excel 2010对原始数据进行初步整理,用DPS 16.05软件对试验数据进行统计分析,以Duncan氏新复极差法进行显著差异性检验。

2 结果与分析

2.1 对桃蚜具有高致病性菌株的筛选

采用体表菌丝挑取法和组织块分离法分离纯化获得5株真菌,编号为BQ-61~BQ-65。致病性测定结果显示,不同菌株对桃蚜的致病性有所差异,孢子浓度为 10^6 个/mL时,各菌株对桃蚜均有致病性,其中菌株BQ-61、BQ-62和BQ-63具有较高致病性,对桃蚜的致死率均超过50.00%,菌株BQ-63的致病性最强,桃蚜的校正死亡率达81.58%,僵虫率也达到最高,为80.78%(表1),因而选定菌株BQ-63为研究对象进行形态学及分子生物学鉴定。

2.2 菌株BQ-63的最适杀蚜浓度

菌株BQ-63各浓度孢子悬浮液均对桃蚜有较高的致病性,校正死亡率均达80.00%以上,孢子浓度为 10^6 ~ 10^8 个/mL时,菌株对桃蚜的致病性逐渐升高,当浓度为 10^8 个/mL时桃蚜死亡率达到最高,为89.53%,校正死亡率为90.10%,僵虫率为89.84%,随着孢子浓度继续升高,菌株BQ-63对桃蚜的致病性略有降低,但无显著差异(表2)。因而,当孢子浓度为 10^8 个/mL时,菌株BQ-63对桃蚜的致病性最强,为最佳杀蚜浓度。

2.3 菌株BQ-63的形态学鉴定

菌株BQ-63在PDA平板上的菌落质地为绒毛至絮状,中央有褶皱,菌落较厚。菌落培养初期为乳白色,稍后变至淡黄色,菌落背面为淡黄色至粉红色(图1)。通过光学显微镜和扫描电镜观察发现,菌

株 BQ-63 产孢细胞呈瓶状簇生于分生孢子梗上,分生孢子梗呈穗状,表面光滑,多着生在营养菌丝上,复向顶部延伸,形成曲膝状的之字型产孢轴,产孢轴每一齿突上着生 1 个分生孢子。分生孢子近球形,单孢,透明,壁薄,表面多光滑,大小为 2.0~3.1 μm×2.0~2.7 μm。初步鉴定该菌株属白僵菌属 *Beauveria*。

表 1 分离自陕西省秦岭僵虫的菌株对桃蚜的致病性

Table 1 The pathogenicity of different strains separated from cadaver of Qinlin, Shaanxi Province to <i>Myzus persicae</i> %			
菌株 Strain	死亡率 Mortality	校正死亡率 Corrected mortality	僵虫率 Rate of corpse
BQ-61	55.33±4.67 bc	50.00±5.22 bc	68.79±2.66 bc
BQ-62	60.00±4.16 b	55.22±4.66 b	68.02±3.51 c
BQ-63	80.33±1.76 a	81.58±3.60 a	80.78±1.29 a
BQ-64	37.33±2.91 d	29.85±3.25 d	42.24±5.07 d
BQ-65	46.67±2.40 cd	40.30±2.69 cd	78.65±1.85 ab
对照 Control	10.67±1.76 e	—	—

表中数据为平均数±标准误。同列数据后不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan’s new multiple range test.

表 2 菌株 BQ-63 不同孢子浓度对桃蚜的致病性评价

Table 2 The pathogenicity of different spore concentrations of BQ-63 strain to <i>Myzus persicae</i> %			
孢子浓度 (个/mL) Spore concentration	死亡率 Mortality	校正死亡率 Corrected mortality	僵虫率 Rate of corpse
10 ⁶	80.33±3.53 b	81.58±3.96 b	80.78±1.91 b
10 ⁷	83.38±0.43 b	83.57±0.48 b	81.95±2.02 b
10 ⁸	89.53±0.41 a	90.10±1.31 a	89.84±1.47 a
10 ⁹	87.47±0.69 a	86.16±1.19 ab	88.26±1.14 a
10 ¹⁰	87.04±0.91 a	85.75±1.16 ab	88.37±0.76 a
对照 Control	10.67±1.76 c	—	—

表中数据为平均数±标准误。同列数据后不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan’s new multiple range test.

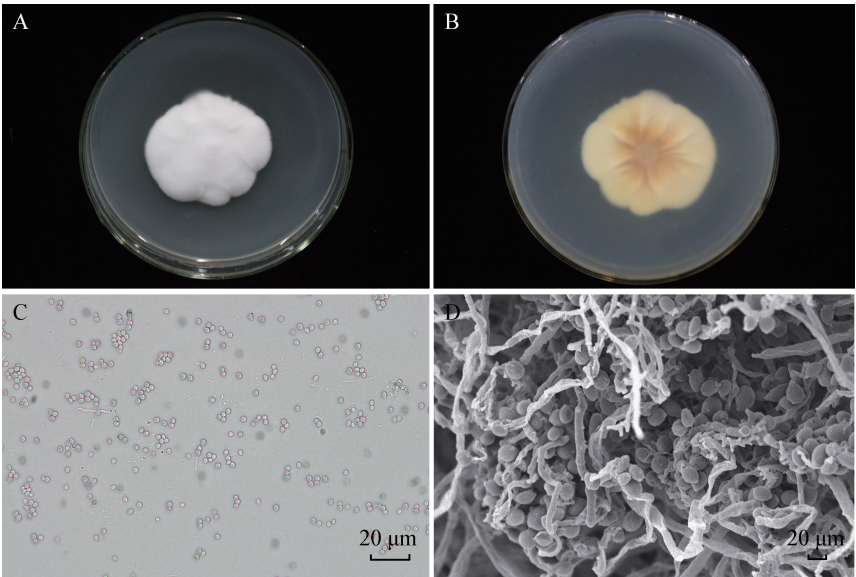


图 1 菌株 BQ-63 在 PDA 培养基上的形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of BQ-63 strain on PDA culture medium

A: 菌落正面; B: 菌落背面; C: 分生孢子光学显微照片; D: 分生孢子及分生孢子梗电镜扫描照片。A: Colony on the positive; B: colony on the back; C: optical microscopy of conidia; D: scanning electron microscopy of conidia and conidiophores.

菌株 BQ-63 在 PDA 平板上培养 7 d 后, 菌落平均生长量为 6.02 mm/d, 培养 3~5 d 时生长速率逐渐增快, 第 5 天时平均生长量最大, 为 9.48 mm/d, 第 6 天开始菌落生长减慢, 平均生长量逐渐降低, 7 d 后菌落直径为 42.15 mm (图 2)。培养至 15 d 时该菌株的产孢量为 3.65×10^8 个/皿, 产孢量较大且产孢速度快。

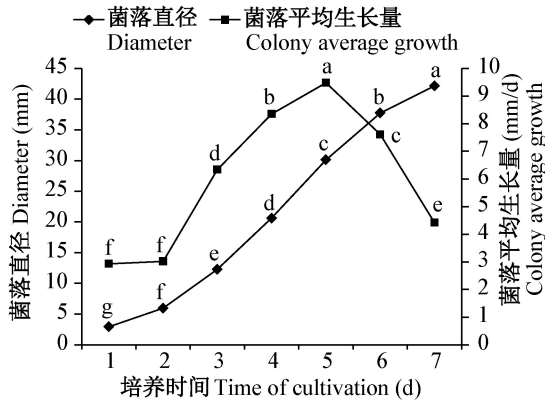


图2 菌株 BQ-63 的菌落直径和菌落平均生长量

Fig. 2 Diameter and average growth of the colonies of BQ-63

同一线上不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著 ($P < 0.05$)。Different letters on the line indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P < 0.05$).

2.4 菌株 BQ-63 的分子生物学鉴定

分别扩增菌株 BQ-63 的 18S rDNA 和 ITS-rDNA 序列片段, 测序结果显示分别获得长度为 1 300 bp 和 547 bp 的片段, 将测序所得序列与 GenBank 中的相关序列进行 BLAST 对比, 与球孢白僵菌的同源性均达到 99% 以上。将得到的 18S rDNA 和 ITS-rDNA 序列片段分别提交到 GenBank 中, 获得登录号为 KU240022 和 KU240023。

基于 18S rDNA 序列片段构建的系统发育树中, 菌株 BQ-63 与球孢白僵菌多株菌株及苏格兰白僵菌 *B. caledonica* 菌株 Arsef 2567 和 CCRC 32867 的亲缘关系较近, 且与球孢白僵菌处于同一分支, 其中与球孢白僵菌菌株 ARSEF 2427 的亲缘关系最近 (图 3-A); 基于 ITS-rDNA 序列片段构建的系统发育树中, 菌株 BQ-63 与球孢白僵菌多株菌株和蛹孢白僵菌 *B. vermiconia* 菌株 IMI 320027 和 ARSEF 2922 的亲缘关系较近, 且与处于同一分支的球孢白僵菌菌株 Bb 9005 的亲缘关系最近 (图 3-B)。结合形态学鉴定结果, 最终将菌株 BQ-63 鉴定为球孢白僵菌 *B. bassiana*。

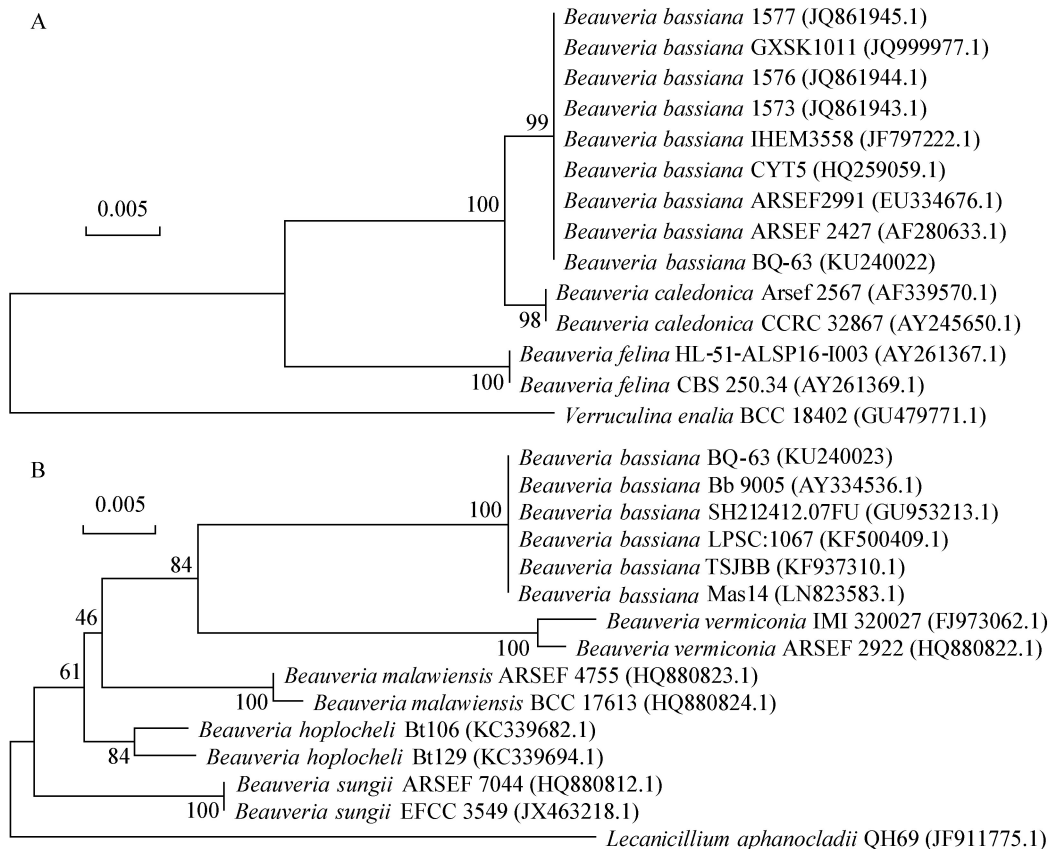


图3 基于 18S rDNA(A)和 ITS-rDNA(B)区域序列构建菌株 BQ-63 及其相关菌株的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of BQ-63 strain and other related strains based on 18S rDNA (A) and ITS-rDNA (B) sequences

3 讨论

可持续农业发展的重要研究领域之一就是生物防治,而微生物农药的研究与利用正是现代生物防治的一大特点(Faria & Wraight, 2001)。迄今为止,我国科研工作者研究发现玫烟色拟青霉 *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown et Smith 菌株 Pfr116 与 Pfr612(陈巍巍和冯明光, 1999)、安徽虫瘟霉 *Zoopthora anhuiensis* (Li) Humber(李惠萍, 2003)、新蚜虫病霉 *Pandora neoaphidis* (Remaud. & Hennebert) Humber(桂富荣等, 2005; 陈斌等, 2008)、诺氏虫病霉 *Pandora nouri* (Remaud. & Hennebert) Humber(李雪雁等, 2003)、蜡蚧轮枝菌 *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas 菌株 V3、V4、KM 9803(徐力文等, 2007; 刘春来等, 2013)及球孢白僵菌 *B. bassiana*(刘银泉等, 1999)等都对桃蚜具有一定的致病性。本研究通过致病性测定,筛选出了对桃蚜具有高致病性的菌株 BQ-63,综合其形态学特征、培养特性、分子生物学鉴定结果,确定该菌株为球孢白僵菌。菌株 BQ-63 对桃蚜的致病性随着处理孢子浓度的升高而逐渐升高,浓度为 10^8 个/mL 时处理 7 d 后的致病性达到最高,桃蚜死亡率为 89.53%,校正死亡率为 90.10%,僵虫率为 89.84%,表明其防治桃蚜的最适孢子浓度为 10^8 个/mL;而相同培养时间下,本研究中各浓度处理对应的桃蚜死亡率均比张永贞等(2008)测定的球孢白僵菌菌株对桃蚜的致死率要高,表明菌株 BQ-63 对桃蚜具有较高的致病性,具有进一步研究的价值。

本研究探究了菌株 BQ-63 的形态学特征和培养特性,其形态学特征与李增智(1991)和胡巍等(1998)所描述的球孢白僵菌形态特点基本相同。经测定菌株 BQ-63 培养 7 d 的平均生长量为 6.02 mm/d,第 7 天菌落直径为 42.25 mm,生长迅速,是陈方新等(2016)分离鉴定的球孢白僵菌菌株生长速率的 2~4 倍。菌株 BQ-63 培养至 15 d 时产孢量为 3.65×10^8 个/mL,产孢量较大且产孢速度快。因而,该菌株具有生长繁殖快的优势,具有生产化应用的潜力。

自 Vuillemin(1912)创立白僵菌属以来,该属内的分类就较混乱,至今并无定论,较为公认的分类方法是依据其分生孢子的形态特征与培养特性进行分类(吴文刚和黄焯, 1985; 胡巍和黄秀梨, 1997)。目前普遍承认的白僵菌有 7 个种(MacLeod, 1954; Samson & Evans, 1982; 李增智, 1991),其中球孢白僵菌寄主范围最广,应用也最为普遍。很多球孢白

僵菌菌株在形态学、生理生化等方面非常相似,如何进行准确地鉴定和分类,是实践应用中的重要问题和研究热点。球孢白僵菌的不同株系,在培养特性和形态结构上也会有所不同,特别是其产孢细胞和产孢结构往往差异明显,其培养特性也会随着培养基及培养条件的改变而有所不同(樊美珍等, 1986)。一些球孢白僵菌菌株的分生孢子为近球形、椭圆形或卵形,与布氏白僵菌 *B. brongniartii* (Sacc.) Petch、多形白僵菌 *B. amorpha* (Hohn) Samson、卵孢白僵菌 *B. tenella* (Sacc.) Siemaszko 等的形态特征类似,因而仅通过形态学鉴定易发生误判(胡巍等, 1998; 黄勃等, 2000)。传统真菌分类学将分生孢子和产孢结构作为主要分类依据,具有一定的局限性,且易受主观影响。随着分子生物学技术的不断发展,PCR 技术在球孢白僵菌鉴定方面的应用也越来越多,为菌株种属的判定提供了更为科学客观的依据。因此,本研究通过形态学鉴定进行初步判断,再结合分子生物学方法对菌株 18S rDNA 和 ITS-rDNA 区域进行 PCR 扩增和序列分析,最终确定该菌株为球孢白僵菌,为其后续研究与应用提供了科学依据。

参 考 文 献 (References)

- Chen B, Li ZY, Xu FH, Gui FR, He SQ, Bai HN. 2008. Virulence of *Pandora neoaphidis* against the different geographical populations of two body-color biotypes of *Myzus persicae* in Yunnan Province. *Journal of Southwest University (Natural Science Edition)*, 30(8): 86–90 (in Chinese) [陈斌, 李正跃, 徐发华, 桂富荣, 和淑琪, 白华楠. 2008. 新蚜虫病霉对不同地区两种体色生物型桃蚜的毒力测定. 西南大学学报(自然科学版), 30(8): 86–90]
- Chen FX, Mei YY, Zhang Q, Qi YX, Ding T. 2016. Isolation and identification of *Beauveria bassiana* from maize rhizosphere soil. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 30(1): 58–64 (in Chinese) [陈方新, 梅玉云, 张强, 齐永霞, 丁婷. 2016. 玉米根际土球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)的分离与鉴定. 核农学报, 30(1): 58–64]
- 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 (in Chinese) [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]
- Chen NC, Luo JT. 1994. The effects of mixtures of phoxim (or dimethoate) and fenvalerate on resistant evolution green peach aphids. *Journal of Plant Protection*, 21(3): 269–274 (in Chinese) [陈年春, 罗记台. 1994. 辛氰和乐氰混剂对甘蓝桃蚜抗性演化的影响. 植物保护学报, 21(3): 269–274]
- Chen WW, Feng MG. 1999. Evaluation on the potential of four imported isolates *Paecilomyces fumosoroseus* as microbial control agents toward the green peach aphid, *Myzus persicae*. *Journal of*

- Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences), 25(6): 563–568 (in Chinese) [陈巍巍, 冯明光. 1999. 四株玫瑰色拟青霉作为桃蚜微生物防治因子的潜力评价. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 25(6): 563–568]
- Fan MZ, Guo C, Zhang B. 1986. Comparison of the infectivity of *Beauveria bassiana* to four species of stem boring insects. Chinese Journal of Biological Control, 2(3): 126–128 (in Chinese) [樊美珍, 郭超, 张波. 1986. 四株球孢白僵菌菌系的初步研究. 中国生物防治学报, 2(3): 126–128]
- Faria M, Wraight SP. 2001. Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. Crop Protection, 20(9): 767–778
- Gao XW, Zheng BZ, Cao BJ. 1992. Resistance in *Myzus persicae* to organophosphorus and carbamate insecticides in China. Journal of Plant Protection, 19(4): 365–371 (in Chinese) [高希武, 郑炳宗, 曹本钧. 1992. 桃蚜对有机磷和氨基甲酸酯抗性机制研究. 植物保护学报, 19(4): 365–371]
- Gu CB, Wang G, Wang KY, Ma H, Guo QL. 2006. Studies on the resistance level of *Myzus persicae*. Journal of Plant Protection, 33(1): 77–80 (in Chinese) [顾春波, 王刚, 王开运, 马惠, 郭庆龙. 2006. 我国西南烟区桃蚜 *Myzus persicae* (Sulzer) 的抗药性水平. 植物保护学报, 33(1): 77–80]
- Gui FR, Li YH, Li ZY. 2005. Effect of temperature on virulence of *Pandora neoaphids* against *Myzus persicae*. Plant Protection, 31(3): 61–64 (in Chinese) [桂富荣, 李亚红, 李正跃. 2005. 不同温度下新蚜虫病霉对桃蚜的毒力测定. 植物保护, 31(3): 61–64]
- He J, Lei BX, Wen TC, Kang JC. 2009. Isolation and identification of one strain entomogenous fungi and preliminary study on insecticidal activity. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 37(10): 4530–4531, 4574 (in Chinese) [何劲, 雷帮星, 文庭池, 康冀川. 2009. 一株虫生真菌的分离鉴定及杀虫活性初探. 安徽农业科学, 37(10): 4530–4531, 4574]
- Hu W, Huang XL. 1997. Research and application of entomogenous fungi in China (Vol. 4). Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, pp. 23 (in Chinese) [胡巍, 黄秀梨. 1997. 中国虫生真菌研究与应用(第4卷). 北京: 中国农业出版社, pp. 23]
- Hu W, Huang XL, Liu W. 1998. Classification of genus *Beauveria* and morphological characters of six species of the *Beauveria*. Journal of Hygiene Research, 27(S1): 133–134 (in Chinese) [胡巍, 黄秀梨, 刘文. 1998. 白僵菌属的分类及种的形态特征. 卫生研究, 27(S1): 133–134]
- Huang B, Li CR, Wang SB, Fan MZ, Li ZZ. 2000. Isolation and identification of three *Beauveria* species from Dabieshan. Journal of Anhui Agricultural University, 27(2): 116–118 (in Chinese) [黄勃, 李春如, 王四宝, 樊美珍, 李增智. 2000. 大别山区三种白僵菌的分离和鉴定. 安徽农业大学学报, 27(2): 116–118]
- Kim JJ, Kim KC, Roberts DW. 2005. Impact of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* on development of an aphid parasitoid, *Aphidius colemani*. Journal of Invertebrate Pathology, 88(3): 254–256
- Li HP. 2003. Bioassay for the virulence of the intensity *Zoophtora anhuiensis* against the green peach aphid *Myzus persicae*. Journal of Shanxi Agricultural University, 23(2): 100–102 (in Chinese) [李惠萍. 2003. 安徽虫瘟霉强毒菌株对桃蚜的毒力测定. 山西农业大学学报, 23(2): 100–102]
- Li S, Wang S, Zhao J, Yang LW, Gao XW, Zhang F. 2014. Efficacy of multicolored Asian lady beetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) against green peach aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) on vegetables under greenhouse conditions. Journal of Plant Protection, 41(6): 699–704 (in Chinese) [李姝, 王魁, 赵静, 杨丽文, 高希武, 张帆. 2014. 释放异色瓢虫对北京温室甜椒和圆茄上桃蚜的控害效果. 植物保护学报, 41(6): 699–704]
- Li XY, Yang Y, Xu WA, Li ZH. 2003. Virulence of *Pandora noursi* Humber against *Myzus persicae*. Pesticides, 42(7): 20–22 (in Chinese) [李雪雁, 杨勇, 许维岸, 李照会. 2003. 诺氏虫病霉对桃蚜的毒力测定. 农药, 42(7): 20–22]
- Li YP, Lei ZR, Wang HH. 2013. Selection of *Beauveria bassiana* strains against *Frankliniella occidentalis* and their conidial production characteristics. Chinese Journal of Biological Control, 29(2): 219–226 (in Chinese) [李银平, 雷仲仁, 王海鸿. 2013. 对西花蓟马高效的球孢白僵菌菌株筛选及产孢特性研究. 中国生物防治学报, 29(2): 219–226]
- Li ZZ. 1991. Classification and identification of the genus *Beauveria*.// Editorial Committee of Research and Application of Entomogenous Fungi in China. Research and Application of Entomogenous Fungi in China Vol. 2. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, pp. 89–95 (in Chinese) [李增智. 1991. 白僵菌的分类和鉴定.//《中国虫生真菌研究与应用》编委会. 中国虫生真菌研究与应用(第2卷). 北京: 中国农业出版社, pp. 89–95]
- Li ZZ, Fan MZ. 2000. Fungal biotechnology and fungal insecticide development.//Yu ZN. Microbial pesticide and its industrialization. Beijing: Science Press, pp. 115–121 (in Chinese) [李增智, 樊美珍. 2000. 真菌生物技术与真菌杀虫剂的发展.//喻子牛. 微生物农药及其产业化. 北京: 科学出版社, pp. 115–121]
- Li ZZ, Huang B, Chen MJ, Wang B, Fan MZ. 2011. Studies on the genus *Beauveria* in molecular era. Mycosystema, 30(6): 823–835 (in Chinese) [李增智, 黄勃, 陈名君, 王滨, 樊美珍. 2011. 分子时代的白僵菌研究. 菌物学报, 30(6): 823–835]
- Li ZY, Zhang QW. 2005. Relative virulence of seven isolates of *Beauveria bassiana* to the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller) and their biological compatibility with ten insecticides. Plant Protection, 31(3): 57–61 (in Chinese) [李正跃, 张青文. 2005. 球孢白僵菌对马铃薯块茎蛾的毒力及其与常用农药的生物相容性测定. 植物保护, 31(3): 57–61]
- Lin HF. 1998. Advances in research on entomogenous fungi. Journal of Anhui Agricultural University, 25(3): 251–254 (in Chinese) [林华峰. 1998. 虫生真菌研究进展. 安徽农业大学学报, 25(3): 251–254]
- Liu CL, Wang S, Li XM, Liu XL, Xia JX, Yang F, Ma L. 2013. The toxicity bioassays of *Verticillium lecanii* strains against *Myzus persicae* in laboratory. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 41(36): 13904–13906 (in Chinese) [刘春来, 王爽, 李新民, 刘兴龙, 夏吉星, 杨帆, 马玲. 2013. 蜡蚧轮枝菌对桃蚜的室内毒力测定

- 研究. 安徽农业科学, 41(36): 13904-13906]
- Liu YQ, Liu SS, Feng MG. 1999. Effect of *Beauveria bassiana* on the fecundity of the green peach aphid, *Myzus persicae*. Journal of Plant Protection, 26(1): 30-34 (in Chinese) [刘银泉, 刘树生, 冯明光. 1999. 球孢白僵菌对桃蚜生殖力的影响. 植物保护学报, 26(1): 30-34]
- MacLeod DM. 1954. Investigation on the genera *Beauveria* Vuill, and *Tritirachium* Limber. Canadian Journal of Botany, 32(6): 818-890
- Meng H, Tian J, Fu SH, Diao HL, Ma RY. 2014. Pathogenicity of *Isaria fumosorosea* and *Beauveria bassiana* against the green peach aphid, *Myzus persicae*. Journal of Plant Protection, 41(6): 717-722 (in Chinese) [孟豪, 田晶, 付淑慧, 刁红亮, 马瑞燕. 2014. 玫瑰烟棒束孢与球孢白僵菌对桃蚜致病力对比. 植物保护学报, 41(6): 717-722]
- Nicolai VM, Eilenberg J. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. Biological Control, 43(2): 145-155
- Poprawski TJ, Parker PE, Tsal JH. 1999. Laboratory and field evaluation of hyphomycete insect pathogenic fungi for control of brown citrus aphid (Homoptera: Aphididae). Environmental Entomology, 28(2): 315-321
- Pu ZL, Li ZZ. 1996. Insect mycology. Hefei: Anhui Science and Technology Press (in Chinese) [蒲蛰龙, 李增智. 1996. 昆虫真菌学. 合肥: 安徽科学技术出版社]
- Samson RA, Evans HC. 1982. Two new *Beauveria* spp. from South American. Journal of Invertebrate Pathology, 39(1): 93-97
- Vuillemin MP. 1912. *Beauveria*, nouveau genre de Verticillacées. Bulletin de la Société Botanique de France, 59(1): 34-40
- Wang B. 2014. Molecular identification of strain mating type of *Beauveria bassiana*. Natural Sciences Journal of Harbin Normal University, 30(1): 62-64 (in Chinese) [王冰. 2014. 球孢白僵菌菌株交配型分子鉴定. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 30(1): 62-64]
- Wang JX, Ma LJ. 2009. Application of entomogenous fungi in biological control of agricultural and forestry pests. Journal of Zhejiang Forestry College, 26(2): 286-291 (in Chinese) [王记祥, 马良进. 2009. 虫生真菌在农林害虫生物防治中的应用. 浙江林学院学报, 26(2): 286-291]
- Wang LJ, Tan WZ, Luo HD, Du XC. 2010. Current status and prospects of entomogenous fungi and its application in biological control of pests. Journal of Henan Agricultural Sciences, 39(4): 119-125 (in Chinese) [王利军, 谭万忠, 罗华东, 杜喜翠. 2010. 虫生真菌及其在害虫生物控制中的应用现状与展望. 河南农业科学, 39(4): 119-125]
- Wang SY, Niu YJ, Tang R, Liang NN, Liu TX. 2016. Feeding and parasitic functional responses of the parasitoid *Aphelinus asychis* Walker to green peach aphid *Myzus persicae* (Sulzer). Journal of Plant Protection, 43(2): 267-274 (in Chinese) [王圣印, 牛雨佳, 唐睿, 梁宁宁, 刘同先. 2016. 短翅蚜小蜂对桃蚜的取食和寄生功能反应. 植物保护学报, 43(2): 267-274]
- Weber G. 1985. Genetic variability in host plant adaptation of the green peach aphid, *Myzus persicae*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 38(1): 49-56
- Wei P, Zhang YT, Wang HX. 2013. Toxicity determination of *Beauveria bassiana* on cotton aphid. Shandong Agricultural Sciences, 45(3): 102-103 (in Chinese) [魏萍, 张永涛, 王恒玺. 2013. 球孢白僵菌对棉蚜的毒力测定. 山东农业科学, 45(3): 102-103]
- Wu WG, Huang F. 1985. Preliminary observation of three species of *Beauveria bassiana* in silkworm. Acta Sericologica Sinica, 11(1): 33-35 (in Chinese) [吴文刚, 黄燠. 1985. 家蚕三种白僵菌的初步观察. 蚕业科学, 11(1): 33-35]
- Xu LW, Zhou TX, Yang ML. 2007. The toxicity bioassays of *Verticillium lecanii* KM9803 strain against three species aphides in laboratory. Journal of Yunnan Agricultural University, 22(2): 208-212 (in Chinese) [徐力文, 周天雄, 杨美林. 2007. 蜡蚧轮枝菌昆明菌株(KM9803)对几种蚜虫的室内毒力测定. 云南农业大学学报, 22(2): 208-212]
- Xu QF. 1991. Safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and its value as a microbial insecticide. Biological Control Bulletin, 7(2): 77-80 (in Chinese) [徐庆丰. 1991. 白僵菌安全性及其作为微生物杀虫剂的评价. 生物防治通报, 7(2): 77-80]
- Yu SH, Zeng MS, Wu GY. 2009. Application and prospect of *Beauveria bassiana*. Tea Science and Technology, (3): 8-11 (in Chinese) [余素红, 曾明森, 吴光远. 2009. 球孢白僵菌的研究应用与展望. 茶叶科学技术, (3): 8-11]
- Zhang YZ, Zhang ZH, Nong XQ, Gao S, Wang GJ, Zhang LS. 2008. Toxicity determination of *Beauveria bassiana* to *Myzus persicae* and its re-infection. Journal of Henan Agricultural Sciences, 37(10): 94-96 (in Chinese) [张永贞, 张泽华, 农向群, 高松, 王广君, 张礼生. 2008. 白僵菌对桃蚜的毒力测定及其再侵染研究. 河南农业科学, 37(10): 94-96]

(责任编辑:李美娟)