

一株侵染美国白蛾的黄曲霉菌的分离及鉴定

Isolation and identification of pathogenic fungus *Aspergillus flavus* infecting fall webworm *Hyphantria cunea*李茵¹ 黄丽莉^{2*} 陈林² 刘虹¹ 胡宇欣² 袁昊^{1,2}

(1. 南昌海关技术中心, 南昌 330038; 2. 豫章师范学院, 南昌 330103)

Li Yin¹ Huang Lili^{2*} Chen Lin² Liu Hong¹ Hu Yuxin² Yuan Hao^{1,2}

(1. Technology Centre of Nanchang Customs, Nanchang 330038, Jiangxi Province, China;

2. Yuzhang Normal University, Nanchang 330103, Jiangxi Province, China)

美国白蛾 *Hyphantria cunea* 是一种食性杂、繁殖量大、适应性强、传播途径广、危害严重的世界性检疫害虫(杨忠岐和张永安, 2007)。自入侵我国以来, 其发生范围和危害程度不断加剧, 给农林业生产造成每年数百亿元的损失。目前, 主要采用化学农药、释放天敌等方法防治, 但长期使用农药易使其产生抗药性且污染环境、伤害非靶标生物。黄曲霉菌 *Aspergillus flavus* 是一种广泛存在于自然界中的丝状真菌, 该菌及其代谢产物可防治多种害虫, 潜力巨大。本研究拟从自然感病美国白蛾样本中分离并鉴定生防菌株, 评估其致病性, 以期探寻美国白蛾的高效生防资源。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源、菌株及叶片: 于2024年9月在湖北省孝感市采集美国白蛾幼虫或蛹样本, 选取具有典型感染症状的样本进行消毒处理后置于马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基上于25℃培养, 待菌落长出后, 挑取形态典型的单菌落进行纯化, 将该菌株命名为YZNUH-01并保存于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 将菌株转入PDA斜面培养基生长5 d后于4℃保存备用。法国梧桐叶片采自豫章师范学院绿化园区。

试剂及仪器: 本研究所用试剂均为国产分析纯。ProFlex 3x32-Well PCR仪, 美国ABI公司; Power Supply电泳仪、Gel Doc XR+全自动凝胶成像分析系统, 美国伯乐公司; ZEISS Axio Imager A2型

光学显微镜, 德国蔡司公司。

2 方法

形态学鉴定: 将菌株YZNUH-01接种于PDA培养基上, 于25℃培养7 d后观察并记录菌落的形状、大小、颜色、质地等特征。同时, 用光学显微镜观察菌丝和分生孢子的形态结构, 包括菌丝的颜色、粗细、分隔情况, 以及分生孢子的形状、大小、表面纹饰等特征, 共制作3个载玻片。

分子生物学鉴定: 采用CTAB法提取纯化菌株的基因组DNA。采用通用引物ITS1(5'-TCCGTAG-GTGAACCTGCGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTA-TTGATATGC-3'), 以DNA为模板对菌株ITS区域进行PCR扩增。25 μL PCR反应体系: DNA模板1 μL、10 μmol/L上下游引物各1 μL、2×Taq PCR Master Mix 12.5 μL, ddH₂O补足至25 μL。PCR反应条件: 94℃预变性5 min; 94℃变性30 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 共35个循环; 72℃终延伸10 min。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后送至生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将测序得到的ITS序列与GenBank数据库中的已知序列进行BLAST比对分析, 以确定菌株的种属关系。

致病性测定: 刮取PDA平板上生长的菌株YZNUH-01孢子于灭菌无菌水中, 振荡混匀后置于血球计数板中统计孢子悬浮液浓度, 终浓度为1×10⁸个/mL。选取健康大小一致的美国白蛾卵、3龄幼虫、蛹、成虫分别放入装有孢子悬浮液的直径9 cm的培养皿中, 不同虫龄均选取20个, 用无菌毛笔蘸取孢子悬浮液

涂布,使其体表均匀附着孢子,然后置于含有新鲜梧桐叶片的1.5 L养虫盒中,以放入装有无菌水的培养皿中作对照。在25℃、相对湿度70%条件下饲养。重复3次。每天观察并记录试虫的发病症状,直至全部幼虫死亡或化蛹。

2 结果与分析

2.1 菌株 YZNUH-01 形态学特征

菌株 YZNUH-01 在 PDA 培养基上生长迅速,菌落呈黄色至黄绿色,表面粗糙,有放射状沟纹。菌落边缘整齐,质地疏松。菌丝无色,有分隔,分枝较多。分生孢子呈球形或近球形,表面光滑,大小均匀,直径约为3~5 μm。根据形态学特征初步鉴定该菌株属于黄曲霉属 *Aspergillus*。

2.2 菌株 YZNUH-01 分子生物学鉴定

PCR 扩增得到的 ITS 序列长度约为 550 bp。将测序结果与 GenBank 数据库中的已知序列进行 BLAST 比对分析,结果显示该菌株与黄曲霉菌的相似度高达 99% 以上。进一步确定菌株 YZNUH-01 为黄曲霉菌 *Aspergillus flavus*。

2.3 致病性测试结果

菌株 YZNUH-01 对美国白蛾的卵、幼虫、蛹和成虫均具有一定的侵染性,但对不同虫态的致病力存在差异。该菌株对卵的致病性相对较低,孵化率有所下降;对幼虫、蛹和成虫的致病性较强,死亡率较高。表明菌株 YZNUH-01 对美国白蛾具有明显的致病性。

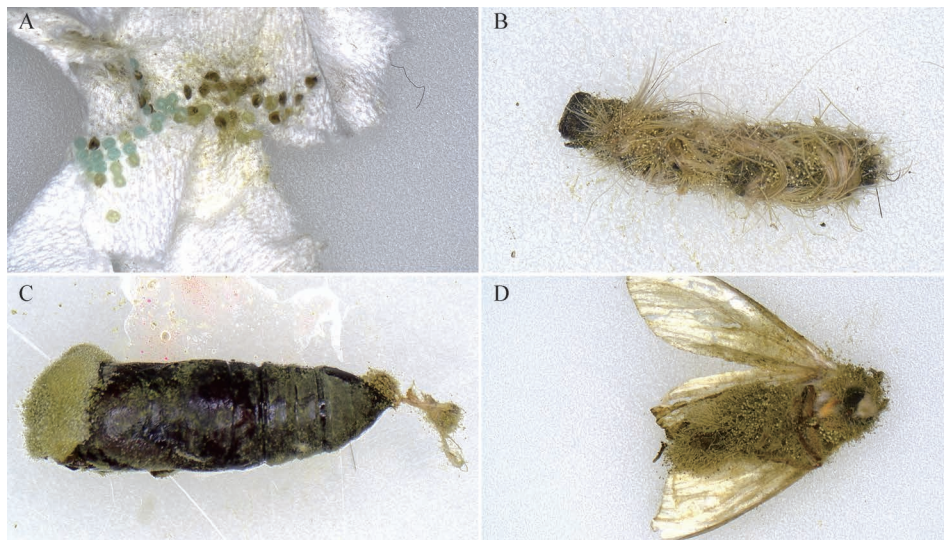


图1 菌株 YZNUH-01 对美国白蛾卵(A)、幼虫(B)、蛹(C)和成虫(D)的侵染

Fig. 1 Infection of eggs (A), nymphs (B), pupae (C), and adults (D) of *Hyphantria cunea* by strain YZNUH-01

3 讨论

黄曲霉菌作为一种重要的昆虫病原真菌,近年来在害虫生物防治领域展现出巨大潜力,如其能侵染牛蜱 *Rhipicephalus microplus* 导致其死亡或生长受阻,从而有效控制牛蜱种群密度(罗丽平等, 2018);其对橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 蛹的侵染率达 100%,从而有效控制害虫的种群密度(尹政等, 2022)。本研究成功从自然感病美国白蛾的样本中分离并鉴定到 1 株黄曲霉菌株 YZNUH-01,并通过致病性测试证实了其对美国白蛾的致病性。该菌株的发现为开发新型生物防治策略提供了供选资源,具有作为生物防治剂的潜力和应用前景。

参考文献 (References)

Luo LP, Wang XY, Yang ZQ, Cao LM. 2018. Research progress in the

management of fall webworm, *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera: Arctiidae). *Journal of Environmental Entomology*, 40(4): 721-735 (in Chinese) [罗立平, 王小艺, 杨忠岐, 曹亮明. 2018. 美国白蛾防控技术研究进展. *环境昆虫学报*, 40(4): 721-735]

Yang ZQ, Zhang YA. 2007. Researches on techniques for biocontrol of the fall webworm, *Hyphantria cunea*, a severe invasive insect pest to China. *Entomological Knowledge*, (4): 465-471, 622 (in Chinese) [杨忠岐, 张永安. 2007. 重大外来入侵害虫: 美国白蛾生物防治技术研究. *昆虫知识*, (4): 465-471, 622]

Yin Z, Zhang J, Diao LG, Wang YL, Zhou HX, Fan YJ, Yang MX, Jin J. 2022. Pathogenicity of *Aspergillus flavus* against *Bactrocera dorsalis* pupae. *Plant Quarantine*, 36(3): 17-22 (in Chinese) [尹政, 张静, 刁立功, 王远路, 周洪旭, 范银君, 杨铭鑫, 金静. 2022. 黄曲霉对桔小实蝇蛹致病性的初步测定. *植物检疫*, 36(3): 17-22]

(责任编辑:王璇)