



雷妍圆, 章玉苹, 薛志洪, 王裕华, 黄少华, 吕利华. 一株球孢白僵菌的分离鉴定及其对草地贪夜蛾的致病性 [J]. 环境昆虫学报, 2020, 42 (3): 593–601.

## 一株球孢白僵菌的分离鉴定及其对草地贪夜蛾的致病性

雷妍圆<sup>1</sup>, 章玉苹<sup>1\*</sup>, 薛志洪<sup>2</sup>, 王裕华<sup>3</sup>, 黄少华<sup>1</sup>, 吕利华<sup>1</sup>

(1. 广东省农业科学院植物保护研究所/广东省植物保护新技术重点实验室, 广州 510640; 2. 广东省农业科学院, 广州 510640; 3. 华南农业大学农学院, 广州 510642)

**摘要:** 草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) 是我国于2019年新发现的一种迁飞性重大害虫。为了寻找对草地贪夜蛾有高致病性的昆虫病原真菌, 本实验对采自广东省广州市华南农业大学湿地的感菌稻黑蜻 *Scotinophara lurida* 若虫僵虫进行了室内分离培养, 结合形态学和 rDNA-ITS 序列分析, 采用浸虫法研究了该菌对草地贪夜蛾各龄幼虫的致病力。鉴定结果表明该病原真菌为球孢白僵菌 *Beauveria bassiana*, 编号为 GZSL-1 菌株。菌株 GZSL-1 可侵染草地贪夜蛾 6 个龄期的幼虫, 随孢子浓度的升高, 草地贪夜蛾幼虫感病死亡率增加, 当浓度达到  $1 \times 10^8$  孢子/mL 时, 1~3 龄幼虫的累计校正死亡率皆为 100%, 4 龄和 5 龄幼虫也达到 57.47% 和 55.06%, 6 龄仅 25.28%。接菌 6 d 后 1~5 龄幼虫的  $LC_{50}$  值分别为  $1.32 \times 10^3$ 、 $3.42 \times 10^3$ 、 $1.01 \times 10^4$ 、 $1.61 \times 10^5$  和  $1.23 \times 10^7$  孢子/mL。幼虫  $LT_{50}$  值随孢子悬浮液浓度增加而递减, 在孢子浓度为  $1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^8$  孢子/mL 范围内, 1 龄、2 龄和 3 龄幼虫的  $LT_{50}$  值分别为 3.58~1.69 d、4.30~1.78 d 和 5.70~3.12 d; 浓度为  $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^8$  孢子/mL 时, 对 4 龄幼虫的  $LT_{50}$  为 5.45~4.85 d; 浓度为  $1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^8$  孢子/mL 时, 对 5 龄幼虫的  $LT_{50}$  为 5.04~5.02 d。上述研究结果表明, 鉴定的球孢白僵菌菌株 GZSL-1 对草地贪夜蛾幼虫具有较强致病性, 可为草地贪夜蛾微生物防治提供候选菌种资源。

**关键词:** 球孢白僵菌; 草地贪夜蛾; 昆虫病原真菌; 鉴定; 致病力

中图分类号: Q965.9; S433.4

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2020) 03-0593-09

### Isolation and identification of a *Beauveria bassiana* isolate and its pathogenicity to *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

LEI Yan-Yuan<sup>1</sup>, ZHANG Yu-Ping<sup>1\*</sup>, XUE Zhi-Hong<sup>2</sup>, WANG Yu-Hua<sup>3</sup>, WANG Shao-Hua<sup>1</sup>, LÜ Li-Hua<sup>1</sup> (1. Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection, Institute of Plant Protection, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China; 2. Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China; 3. College of Agriculture, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), is a newly global migratory pest to China in 2019. To enrich the resource of entomopathogenic fungi for *S. frugiperda* biocontrol, fungi infected *Scotinophara lurida* nymphs were collected from wetland in South China

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFD0300104); 广东省重点领域研发计划资助 (2020B020224002); 广东省现代农业产业技术体系创新团队 (2019KJ1113)

作者简介: 雷妍圆, 女, 博士, 副研究员, 主要从事农业害虫生物防治研究, E-mail: leiyy@gdppri.com

\* 通讯作者 Author for correspondence: 章玉苹, 博士, 研究员, 主要从事病虫害高效生物农药研制与开发研究, E-mail: zhangyp@gdppri.com

收稿日期 Received: 2020-03-18; 接受日期 Accepted: 2020-04-09

Agricultural University, Guangzhou City, Guangdong Province. The strain were isolated, and the species was identified based on morphological and rDNA-ITS sequence analysis, the pathogenicity of the strain to *S. frugiperda* larvae was studied in laboratory by immersing larvae of different instars into serial concentrations of conidial suspension. Results showed that this strain was identified as *Beauveria bassiana*, named GZSL-1. Larvae from 1<sup>st</sup> to 6<sup>th</sup> instar were infected by *B. bassiana* strain GZSL-1. The mortality rates of the *S. frugiperda* caused by infection of *B. bassiana* increased with the concentration of conidial suspension and the time after treatment. The highest concentration ( $1 \times 10^8$  conidia/mL) treatment caused 100%, 100%, 100%, 57.47%, 55.06%, and 25.28% corrected mortality for 1<sup>st</sup> to 6<sup>th</sup> instar larvae on the 6<sup>th</sup> day, respectively. The estimated LC<sub>50</sub> values of 1<sup>st</sup> to 5<sup>th</sup> instar larvae on day 6 after treatment were  $1.32 \times 10^3$ ,  $3.42 \times 10^3$ ,  $1.01 \times 10^4$ ,  $1.61 \times 10^5$ , and  $1.23 \times 10^7$  conidia/mL, respectively. Values of LT<sub>50</sub> of all tested instars were shortened with concentration. The LT<sub>50</sub> values of 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> instar were 3.58 ~ 1.69 days, 4.30 ~ 1.78 days, and 5.70 ~ 3.12 days, respectively, in the range of  $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^8$  conidia/mL. The LT<sub>50</sub> values of 4<sup>th</sup> instar were 5.45 ~ 4.85 days in the range of  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$  conidia/mL. The LT<sub>50</sub> values of 5<sup>th</sup> instar were 5.04 ~ 5.02 days in the range of  $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$  conidia/mL. The results suggested that the *B. bassiana* strain GZSL-1 is a promising candidate for use in microbial control of *S. frugiperda*.

**Key words:** *Beauveria bassiana*; *Spodoptera frugiperda*; entomopathogenic fungi; identification; pathogenicity

草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 是联合国粮食与农业组织 (FAO) 预警的跨国界迁飞性害虫, 已在美洲、非洲及亚洲等近 100 个国家迅速扩散, 对当地玉米、水稻、甘蔗、高粱、棉花、花生、大豆等作物造成了巨大损失 (Casmuze *et al.*, 2010; Early *et al.*, 2018; 姜玉英等, 2019; 张磊等, 2019)。自 2019 年 1 月以来, 该虫从境外迁入我国西南、华南地区, 短短数月迅速向北蔓延, 至目前发生区域已涉及全国近 20 多个省份, 对我国农业生产构成严重威胁 (廖永林等, 2019; 王磊等, 2019; 杨普云等, 2019)。

目前草地贪夜蛾防控主要依赖化学农药, 但该虫对农药具有较强抗性 (Yu *et al.*, 2003; Ríos-Díez & Saldamando-Benjumea, 2011; Carvalho *et al.*, 2013; 李永平等, 2019), 化学防治易产生农药残留, 对人、畜和非靶标生物造成伤害。植保工作者在其物理、生物防治方面做了很多工作, 到目前为止, 仍未有一种生防病原真菌能对草地贪夜蛾起到完全的控制效果。然而, 昆虫病原真菌以其寄主范围广、扩散力强、易于商品化生产和可持续性控制虫害等优势在对草地贪夜蛾的防治中具有重要的应用前景 (Shah & Pell, 2003; 张礼生和陈红印, 2014; Rivero-Borja *et al.*, 2018; 陈万斌等, 2019; 张维等, 2019)。由于草地贪夜蛾入侵我国时间较短, 对其微生物防治研究起步

较晚, 筛选对草地贪夜蛾高特异性和高效率的病原真菌, 大力推动微生物杀虫剂的研究与利用, 是我国草地贪夜蛾可持续防控工作的重要任务。

在昆虫病原真菌防控草地贪夜蛾方面, 国内外报道球孢白僵菌 *Beauveria bassiana*、金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 和莱氏绿僵菌 *Metarhizium rileyi* 对草地贪夜蛾卵和低龄幼虫有一定的防治效果 (Lezama Gutiérrez *et al.*, 1996, 2001; Carneiro *et al.*, 2008; García *et al.*, 2011; Thomazoni *et al.*, 2014; Akutse *et al.*, 2019; 郑亚强等, 2019)。玫烟色虫草 *Cordyceps fumosorosea* [原玫烟色棒束孢 *Isaria fumosorosea* (Kepler *et al.*, 2017)] 可致病幼虫各龄期, 对低龄防效最佳 (Lezama Gutiérrez *et al.*, 2001; 雷妍圆等, 2020)。从已报道的菌株来看, 大部分仅对草地贪夜蛾卵和低龄幼虫防效较好, 对 3 龄以上高龄幼虫及其他虫态的防效普遍较差。白僵菌 *Beauveria* spp. 是 100 多属昆虫病原真菌中最常见和最重要的属之一, 在我国现已发现的所有白僵菌种之中, 球孢白僵菌作为一种广谱性微生物杀虫剂, 在农业害虫防治中具有重要地位 (Hajek & St. Leger, 1994)。我国利用球孢白僵菌在马尾松毛虫和玉米螟防治中的应用也成为了世界上最大规模的真菌杀虫剂应用项目 (李增智, 2015)。本研究室从广州地区野外采集的感菌稻黑蟥上分离纯化获得 1 株病原真菌, 对其进

行了形态学鉴定和 ITS-rDNA 序列分析, 通过致病性测定, 确定其最佳杀虫活性的孢子悬浮液浓度, 以期寻求对草地贪夜蛾更加持续且高效的生物防治方法提供研究材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试虫源和菌株分离培养

草地贪夜蛾幼虫采集于广东省广州市白云区钟落潭镇广东省农业科学院白云基地“粤甜 28”甜玉米 *Zea mays* L. 植株上, 在实验室用玉米叶和果穗饲养至化蛹, 待其羽化产卵后建立实验室种群作为供试虫源。室内饲养条件为  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , 相对湿度 60% ~ 90%, 光照条件 14 L:10 D。

昆虫病原真菌采自广东省广州市华南农业大学湿地狐尾藻上罹病稻黑蜻 *Scotinophara lurida* 若虫僵虫 (图 2 A), 将带菌虫体置于灭菌培养皿 ( $d=9\text{ cm}$ ), 在超净工作台中用接种针轻轻挑起少量孢子, 采用划线法接种于萨氏培养基 SDAY (葡萄糖 40 g, 蛋白胨 10 g, 酵母膏 10 g, 琼脂 15 ~ 20 g, 蒸馏水 1 L), 于  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , 全黑暗, 相对湿度 70% 的恒温培养箱中培养。培养 6 d 后, 挑取少量孢子至新的培养基纯化培养 15 d, 平板上长出的菌落形态特征一致, 将该菌编号为 GZSL-1。将纯化的菌株分生孢子置于 20% 甘油, 并保存于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱中。

### 1.2 菌株培养形态观察

分离纯化的菌株 GZSL-1 接种于 PDA 培养基 (马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 15 ~ 20 g, 蒸馏水 1 L), 于  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , 全黑暗, 相对湿度 70% 的恒温培养箱中培养 10 d。采用光学显微镜 (Axio Scope A1, Zeiss) 和扫描电镜 (S-3400N, Hitachi) 观察菌落形态特征、菌株产孢结构和分生孢子形态等显微结构。

### 1.3 菌株分子生物学鉴定

以菌株 GZSL-1 基因组 DNA 为模板, 采用真菌通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCCG-3') /ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 进行菌株 rDNA-ITS 序列 PCR 扩增。PCR 反应体系为 25  $\mu\text{L}$ , 其中上下游引物各 1.5  $\mu\text{L}$ ,  $2 \times$  Taq PCR Master Mix 10  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 2  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 10  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件:  $94^\circ\text{C}$  预变性 5 min;  $94^\circ\text{C}$  变性 45 s,  $55^\circ\text{C}$  退火 30 s;  $72^\circ\text{C}$  延伸 1 min, 30 个循环;  $72^\circ\text{C}$  延伸 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后送北京擎科新业生物技术有限公司测序。

### 1.4 系统发育分析

对菌株 rDNA-ITS 测序结果进行编辑, 去除序列两端质量不好的碱基, 将优化好的 ITS 序列提交到 NCBI 网站 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 通过 BLAST 程序进行比对, 得到与目的菌株具有同源性的多个菌株相应序列, 从中下载同源性较高的序列, 使用 MEGA 7.0 软件, 通过邻接法 (Neighbor-Joining method, NJ), 运行 1 000 次 bootstrap 验证, 构建系统发育树 (Kumar *et al.*, 2004)。

### 1.5 菌株对草地贪夜蛾幼虫感染症状观察

从 SDAY 平板上收集菌株 GZSL-1 分生孢子, 以灭菌 0.05% 吐温-80 溶液配制  $1 \times 10^8$  孢子/mL 浓度孢子悬浮液, 分别接种草地贪夜蛾 1 ~ 6 龄幼虫, 接种后每天观察幼虫存活情况及感染病虫的外部特征, 将死亡幼虫保湿培养, 虫体表面长出白色菌丝或分生孢子的视为感菌致死。

### 1.6 菌株对草地贪夜蛾幼虫的致病力测定

采用浸虫法处理草地贪夜蛾幼虫, 以灭菌 0.05% 吐温-80 溶液配制  $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、和  $1 \times 10^8$  孢子/mL 共 5 个浓度梯度的孢子悬浮液, 每个浓度为一个处理, 以灭菌 0.05% 吐温-80 溶液处理为对照。选取个体大小一致的 1 ~ 6 龄幼虫, 放入供试孢子浓度的悬浮液中, 浸渍 10 s 后挑出, 置于滤纸上吸去多余水分, 移至皿底垫有湿润滤纸片的培养皿 ( $d=7.5\text{ cm}$ ) 中。为避免高龄幼虫自相残杀, 1 ~ 2 龄幼虫高密度集体饲养 (10 头/皿), 3 龄幼虫低密度集体饲养 (5 头/皿), 4 ~ 6 龄幼虫单头饲养 (1 头/皿), 皿内放入充足的新鲜玉米叶供其取食 (王道通等, 2019)。处理后的幼虫置于人工气候箱中饲养 ( $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , RH 80%  $\pm$  5%, 14 L:10 D)。每个处理 20 ~ 30 头幼虫, 重复 3 次, 持续观察 6 d, 每天记录幼虫死亡数, 对死亡幼虫进行保湿观察, 确定是否为感菌致死。

### 1.7 数据处理

累计死亡率 (%) = (处理死亡总虫数/处理总虫数)  $\times$  100

累计校正死亡率 (%) = (处理累计死亡率 - 对照累计死亡率) / (1 - 对照累计死亡率)  $\times$  100

实验数据经 Excel 整理后, 使用 SPSS 20.0 软件进行处理分析, 统计各处理幼虫的累计死亡率和累计校正死亡率。采用 Probit 方法计算致死中时 ( $LT_{50}$ ), 求回归方程及计算致死中浓度 ( $LC_{50}$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株培养形态特征及分子生物学鉴定

对分离纯化培养的菌株形态特征进行鉴定, 观察菌株平板正面菌落培养初期呈乳白色, 后略变为淡沙黄色, 孢子层厚且均匀, 菌落边缘孢子较少, 菌落生长速度快, 在 PDA 培养基上 28℃ 培养 7 d 时, 菌落直径达到 24.5 mm, 菌落中心至边缘 1/2 处凸起同心环 (图 2 B)。菌落背面黄色, 无深褐色环 (图 2 C)。营养菌丝无色, 分生孢子梗着生于营养菌丝, 分生孢子在菌丝或孢囊上簇生, 着生在产孢细胞延伸而成的“之”字形结构

上; 分生孢子透明、光滑, 球形或近球形, 直径 2.0 ~ 2.3 μm (图 2 D)。

使用 PCR 扩增目的菌株的 rDNA-ITS 序列片段, 测序结果显示扩增片段为 498 bp, 将该序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对, 发现目的菌株的 ITS 序列与已报道的多个球孢白僵菌菌株对应序列的相似性均达到 99% 及以上。选取相关序列, 使用 MEGA 7.0 将其在 NCBI 数据库中比对得到的序列下载构建系统发育树 (图 1)。本目的菌株与 *B. bassiana* TNS/DWD/BB05 (MK346250.1) 处于进化树最小分支, 亲缘关系最近, 同源性最高。结合形态学鉴定结果, 确定该菌为球孢白僵菌, 编号 GZSL-1 菌株。

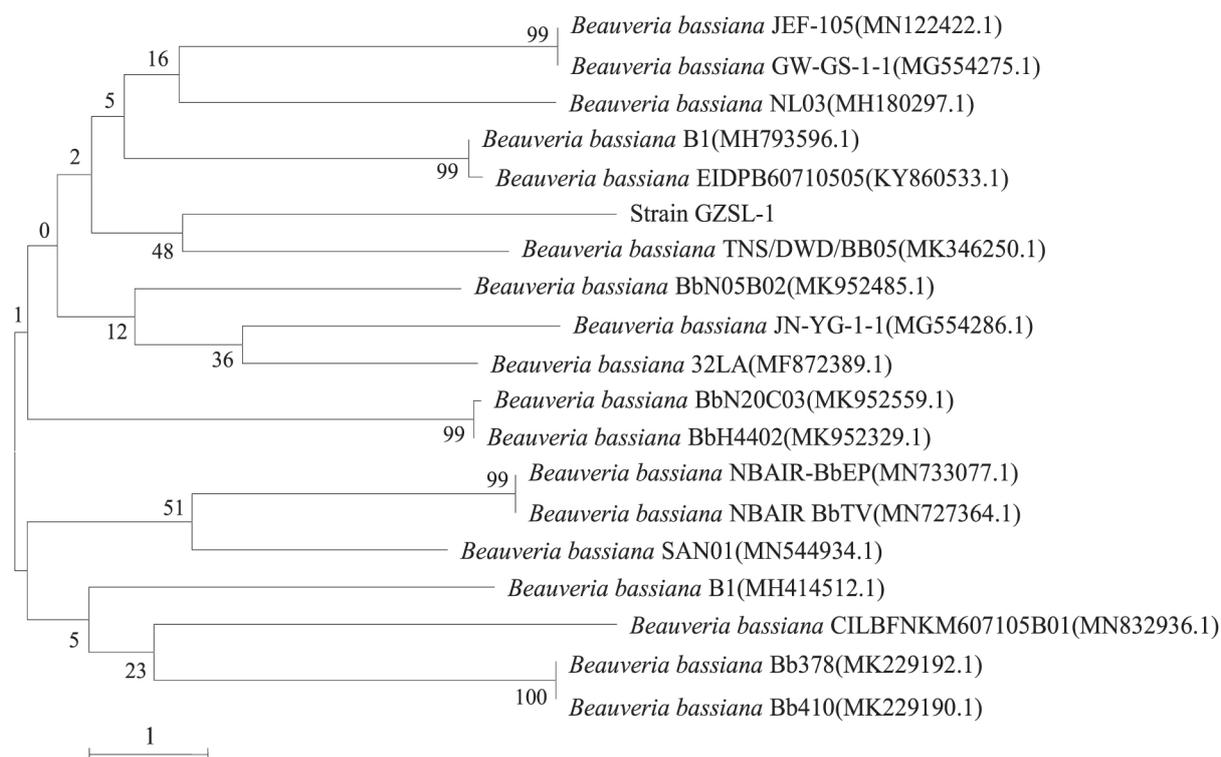


图 1 基于 ITS 基因序列构建目的菌株与其他球孢白僵菌的系统发育树 (NJ 法)

Fig. 1 Construction of phylogenetic tree of the isolated strain and other related *Beauveria bassiana* strains based on ITS region sequence (Neighbour-Joining method)

注: 括号内为菌株在 GenBank 中的登录号; 各分枝上的数字表示支持率。Note: The numbers in parentheses represent GenBank accession numbers. The numbers in each branch points denote the percentages supported by bootstrap.

### 2.2 感染球孢白僵菌 GZSL-1 的草地贪夜蛾幼虫症状

草地贪夜蛾各龄幼虫皆可被菌株 GZSL-1 感染 (图 2 E-J)。在感菌初期, 幼虫取食行为、虫体外部形态与健康幼虫无差别。接种 2 d 后, 低龄幼虫 (1~3 龄) 幼虫取食明显减少或停止取食, 部分

幼虫死亡。接种后第 4 天, 各龄期幼虫皆出现球孢白僵菌感染致死个体。感菌的低龄幼虫体表覆盖菌丝和分生孢子, 分生孢子呈白色。高龄幼虫 (4~6 龄) 感菌死亡时间相对低龄较晚, 体表被白色菌丝包裹。



图2 菌株 GZSL-1 培养特征和草地贪夜蛾幼虫感染症状

Fig. 2 Morphological characteristics of strain GZSL-1 on PDA plate and external symptoms of larvae of *Spodoptera frugiperda* after infection treatment

注: A, 野外被球孢白僵菌侵染的稻黑蜻若虫僵虫; B, 菌落正面; C, 菌落背面; D, 分生孢子和菌丝体; E, 1 龄幼虫; F, 2 龄幼虫; G, 3 龄幼虫; H, 4 龄幼虫; I, 5 龄幼虫; J, 6 龄幼虫。Note: A, symptoms of infected *Scotinophara lurida* nymphs in field; B, colony on the positive; C, colony on the back; D, conidia and mycelium; E, 1<sup>st</sup> instar larva; F, 2<sup>nd</sup> instar larva; G, 3<sup>rd</sup> instar larva; H, 4<sup>th</sup> instar larva; I, 5<sup>th</sup> instar larva; J, 6<sup>th</sup> instar larva.

### 2.3 球孢白僵菌 GZSL-1 对草地贪夜蛾幼虫的致病力测定

用 5 个浓度球孢白僵菌 GZSL-1 孢子悬浮液处理草地贪夜蛾 1~6 龄幼虫, 随着孢子浓度增加和时间推移, 幼虫累计死亡率逐渐升高(图 3)。以  $1 \times 10^4$  孢子/mL 浓度处理, 6 d 后 1~6 龄幼虫的累计校正死亡率分别为 76.47%、65.12%、48.24%、36.78%、13.48% 和 5.75%。随着浓度的升高, 菌株对各龄幼虫的致死率逐渐升高。当孢子浓度为  $1 \times 10^8$  孢子/mL 时, 1 至 3 龄幼虫的累计校正死亡率均达 100%, 4 龄和 5 龄幼虫也分别达 57.47% 和 55.06%, 6 龄仅 25.28%。

应用 Probit 模型, 计算球孢白僵菌 GZSL-1 处理的草地贪夜蛾 1~5 龄幼虫  $LC_{50}$  值(表 1), 其分别为  $1.32 \times 10^3$ 、 $3.42 \times 10^3$ 、 $1.01 \times 10^4$ 、 $1.61 \times 10^5$  和  $1.23 \times 10^7$  孢子/mL。结果表明致中死浓度, 1 龄和 2 龄幼虫最低, 均为  $10^3$  孢子/mL, 3~4 龄为  $10^4$  和  $10^5$  孢子/mL, 对 5 龄幼虫的  $LC_{50}$  最高,  $10^7$  孢子/mL。草地贪夜蛾 1~4 龄幼虫对该菌株较敏感, 其次 5 龄, 6 龄幼虫敏感性最低。

### 2.4 球孢白僵菌 GZSL-1 对草地贪夜蛾幼虫的致死时间效应

随球孢白僵菌 GZSL-1 孢子悬浮液浓度的增加, 草地贪夜蛾幼虫的致死中时 ( $LT_{50}$ ) 缩短(表 2)。孢子浓度越高, 幼虫的  $LT_{50}$  值越小, 在  $1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^8$  孢子/mL 范围内, 1 龄幼虫  $LT_{50}$  从 3.58 d 降至 1.69 d, 对 2 龄幼虫的  $LT_{50}$  从 4.30 d 降至 1.78 d, 对 3 龄幼虫的  $LT_{50}$  从 5.70 d 降至 3.12 d; 在浓度为  $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^8$  孢子/mL 的范围内, 对 4 龄幼虫的  $LT_{50}$  从 5.45 d 降至 4.85 d; 在浓度为  $1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^8$  孢子/mL 的范围内, 对 5 龄幼虫的  $LT_{50}$  从 5.04 d 降至 5.02 d。当孢子浓度为  $1.0 \times 10^4$  孢子/mL 时, 4 龄幼虫最终死亡率为 38.89%, 低于 50%; 当浓度为  $1.0 \times 10^4$  和  $1.0 \times 10^6$  孢子/mL 时, 5 龄的最终死亡率从 14.45% 升至 37.71%, 6 龄的最终死亡率从 8.89% 升至 15.56%, 均低于 50%; 浓度为  $1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^8$  孢子/mL 时, 6 龄幼虫的最终死亡率从 21.11% 升至 27.80%, 亦低于 50%, 因此无法计算  $LT_{50}$  值。

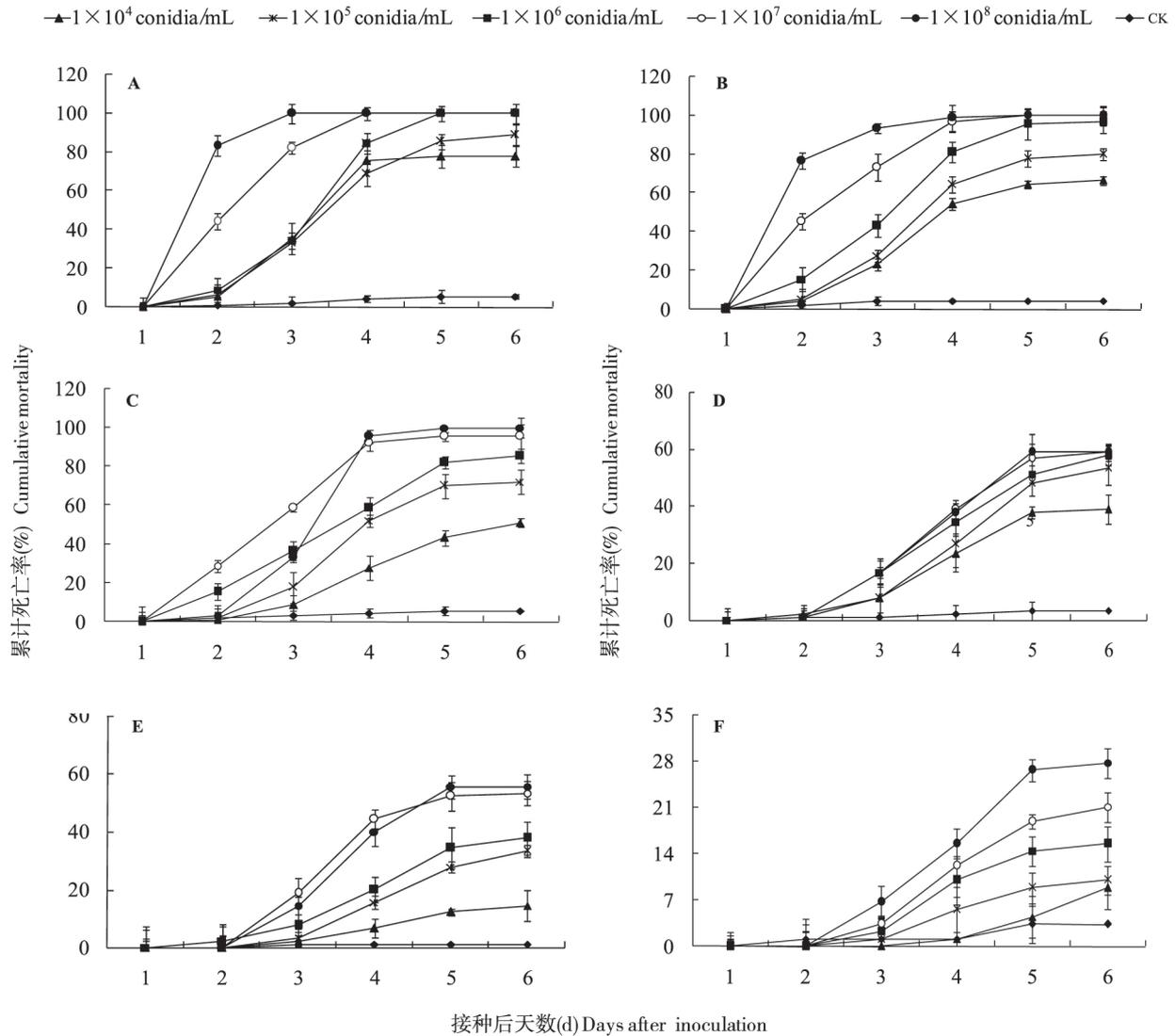


图3 球孢白僵菌 GZSL-1 对草地贪夜蛾幼虫的致病力

Fig. 3 The pathogenicity of *Beauveria bassiana* strain GZSL-1 against *Spodoptera frugiperda* larvae

注: A, 1 龄; B, 2 龄; C, 3 龄; D, 4 龄; E, 5 龄; F, 6 龄。Note: A, 1<sup>st</sup> instar; B, 2<sup>nd</sup> instar; C, 3<sup>rd</sup> instar; D, 4<sup>th</sup> instar; E, 5<sup>th</sup> instar; F, 6<sup>th</sup> instar.

表1 球孢白僵菌 GZSL-1 对草地贪夜蛾幼虫的致病力回归方程

Table 1 Regression equations of pathogenicities of *Beauveria bassiana* strain GZSL-1 against *Spodoptera frugiperda* larvae

龄期 Instar	致病力回归方程 Pathogenicity regression equation	$\chi^2$	<i>P</i>	LC <sub>50</sub> (孢子/mL)	95% 置信限 95% confidence limits
1 龄 1 <sup>st</sup> instar	$Y = -2.425 + 0.777X$	3.623	0.305	$1.32 \times 10^3$	$1.43 \times 10^2 \sim 3.83 \times 10^3$
2 龄 2 <sup>nd</sup> instar	$Y = -2.518 + 0.713X$	3.203	0.361	$3.42 \times 10^3$	$8.79 \times 10^2 \sim 7.85 \times 10^3$
3 龄 3 <sup>rd</sup> instar	$Y = -2.336 + 0.583X$	1.410	0.703	$1.01 \times 10^4$	$3.49 \times 10^3 \sim 2.15 \times 10^4$
4 龄 4 <sup>th</sup> instar	$Y = -1.631 + 0.121X$	2.677	0.444	$1.61 \times 10^5$	$7.45 \times 10^2 \sim 1.51 \times 10^6$
5 龄 5 <sup>th</sup> instar	$Y = -1.994 + 0.281X$	4.143	0.246	$1.23 \times 10^7$	$4.28 \times 10^6 \sim 5.68 \times 10^7$
6 龄 6 <sup>th</sup> instar	-	-	-	-	-

注: 表中数据为平均值 ± 标准差 “-” 表示草地贪夜蛾幼虫的最终死亡率低于 50%, 无法估算 LC<sub>50</sub>。Note: Data in a column are presented as mean ± SD. “-” represent that the mortality of infected larvae was less than 50%, LC<sub>50</sub> values cannot be estimated.

表 2 球孢白僵菌 GZSL-1 对草地贪夜蛾幼虫的致死中时间  
Table 2 The median lethal time of *Beauveria bassiana* strain GZSL-1 to *Spodoptera frugiperda* larvae

孢子浓度 (孢子/mL) Conidial concentrations	LT <sub>50</sub> (d)					
	1 龄 1 <sup>st</sup> instar	2 龄 2 <sup>nd</sup> instar	3 龄 3 <sup>rd</sup> instar	4 龄 4 <sup>th</sup> instar	5 龄 5 <sup>th</sup> instar	6 龄 6 <sup>th</sup> instar
1 × 10 <sup>4</sup>	3.58 ± 0.21	4.30 ± 0.40	5.70 ± 0.56	—	—	—
1 × 10 <sup>5</sup>	3.49 ± 0.34	3.81 ± 0.56	4.31 ± 0.65	5.45 ± 0.64	—	—
1 × 10 <sup>6</sup>	3.09 ± 0.17	3.01 ± 0.38	3.50 ± 0.67	5.10 ± 0.39	—	—
1 × 10 <sup>7</sup>	2.15 ± 0.09	2.22 ± 0.09	2.60 ± 0.16	4.88 ± 0.55	5.02 ± 0.27	—
1 × 10 <sup>8</sup>	1.69 ± 0.07	1.78 ± 0.06	3.12 ± 0.21	4.85 ± 0.40	5.04 ± 0.12	—

注: 表中数据为平均值 ± 标准差 “—” 表示草地贪夜蛾幼虫的最终死亡率低于 50%, 无法估算 LT<sub>50</sub>。Note: Data in a column are presented as mean ± SD. “—” represent that the mortality of infected larvae was less than 50%, LT<sub>50</sub> values cannot be estimated.

### 3 结论与讨论

我国微生物资源丰富, 发展生物农药具有充分的优势。为进一步丰富草地贪夜蛾生物防治菌种资源, 本研究从采集的感菌稻黑蜡若虫分离获得 1 株对草地贪夜蛾有高致病性的昆虫病原真菌 GZSL-1, 根据该菌株培养形态特征及 ITS 序列比对分析, 将其鉴定为球孢白僵菌。菌株 GZSL-1 对草地贪夜蛾 1 龄至 6 龄幼虫皆有侵染效果, 但龄期间的致病力差异较大。在同一孢子浓度下, 对低龄幼虫的致病力大于高龄幼虫, 对高龄幼虫的 LC<sub>50</sub> 远大于低龄幼虫的 LC<sub>50</sub>, 即使以高浓度孢子悬浮液侵染, 对 6 龄幼虫的致死率仅 25.28% (1.0 × 10<sup>8</sup> 孢子/mL), 这与以往报道的草地贪夜蛾病原真菌相类似, 绝大部分仅对草地贪夜蛾低龄幼虫防效较好 (Lezama Gutiérrez *et al.*, 2001; Carneiro *et al.*, 2008; García *et al.*, 2011; Thomazoni *et al.*, 2014; Akutse *et al.*, 2019; 郑亚强等, 2019; 雷妍圆等, 2020)。尽管菌株 GZSL-1 对 4 龄和 5 龄幼虫具有一定程度的致病力, 但也仅为 50% 的致死率, 因此利用球孢白僵菌 GZSL-1 防治草地贪夜蛾幼虫的适期是低龄幼虫种群的高峰期。

筛选昆虫病原真菌高效菌株时, 致病力是衡量其防效潜力的重要指标之一。目标害虫死亡率越高且 LT<sub>50</sub> 越短, 意味着菌株具有更好的致病力。据报道, 用 35 株球孢白僵菌 *B. bassiana* 菌株和 14 株金龟子绿僵菌 *M. anisopliae* 对草地贪夜蛾进行致病力筛选, 仅有 1 株球孢白僵菌菌株 Unioeste 26 可导致草地贪夜蛾 3 龄幼虫 44.5% 死亡率

(Thomazoni *et al.*, 2014)。对分离自非洲的 6 个球孢白僵菌和 14 个绿僵菌的杀虫效果进行分析, 在 1.0 × 10<sup>8</sup> 孢子/mL 的孢子浓度下, 大部分的绿僵菌株对卵、初孵幼虫和 2 龄幼虫有高于 80% 的致病力, 但仅有一株球孢白僵菌 ICIPE 676 对 2 龄幼虫造成 30% 的死亡率 (Akutse *et al.*, 2019)。此外, 另有报道 1 株球孢白僵菌菌株 Bb42 对草地贪夜蛾 2 龄幼虫的 LC<sub>50</sub> 为 5.92 × 10<sup>3</sup> 孢子/mL, 且 1.0 × 10<sup>9</sup> 孢子/mL 时, 其 2 龄幼虫死亡率达 96.6%, 致死中时 LT<sub>50</sub> 为 3.6 d (García *et al.*, 2011)。本研究表明, 对于龄期相同的 2 龄幼虫, 供试球孢白僵菌 GZSL-1 的 LC<sub>50</sub> 为 3.42 × 10<sup>3</sup> 孢子/mL, 略低于前者的 5.92 × 10<sup>3</sup> 孢子/mL; 当处理孢子悬浮液浓度低于前者, 仅为 1.0 × 10<sup>8</sup> 孢子/mL 时, 1~3 龄幼虫的累计死亡率皆达 100%, 较 Bb42 的致病力强; 再以 2 龄幼虫 LT<sub>50</sub> 值比较, 当孢子浓度为 1.0 × 10<sup>8</sup> 孢子/mL 时, 本研究仅 1.78 d, 较前者的致死速度快。表明本研究中供试球孢白僵菌 GZSL-1 对草地贪夜蛾幼虫具有较高的致死率和较短的致死中时, 菌株具有较强的致病力, 有进一步研究的价值。

球孢白僵菌作为一种重要的昆虫病原真菌, 其制剂的应用开发潜力巨大, 但球孢白僵菌菌株具异核现象, 从虫尸上分离的野生型菌株多为异核体, 由于异核体稳定, 人工培养基上继代培养过程中, 异核内核比例不断变化, 更适应于培养基腐生类型的核被选择出来占优势, 这意味着分离出来的菌株在腐生条件下存在变异和退化可能。从菌株分离、毒力保持到利用白僵菌菌剂在自然

环境中进行大规模害虫防治, 仍然面临着诸多问题。虽然本研究中的球孢白僵菌 GZSL-1 对草地贪夜蛾幼虫具有较强致病力, 这说明在室内条件合适时可起如此大的作用, 但在田间应用时是否有同样的致病力, 以及如何挖掘菌株本身的潜力去适应外界条件, 还有许多工作要做。

### 参考文献 (References)

- Akutse KS, Kimemia JW, Ekesi S, et al. Ovicidal effects of entomopathogenic fungal isolates on the invasive fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Journal of Applied Entomology*, 2019, 143 (6): 626–634.
- Carneiro AA, Gomes EA, Guimarães CT, et al. Molecular characterization and pathogenicity of isolates of *Beauveria* spp. to fall armyworm [J]. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 2008, 43 (4): 513–520.
- Carvalho RA, Omoto C, Field LM, et al. Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8 (4): e62268.
- Casmuze A, Juárez ML, Socías MG, et al. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 2010, 69 (3–4): 209–231.
- Chen WB, Li YY, Wang MQ, et al. Entomopathogen resources of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*, and their application status [J]. *Plant Protection*, 2019, 45 (6): 1–9. [陈万斌, 李玉艳, 王孟卿, 等. 草地贪夜蛾的昆虫病原微生物资源及其应用现状 [J]. *植物保护*, 2019, 45 (6): 1–9]
- Early R, González – Moreno P, Murphy ST, et al. Forecasting the global extent of invasion of the cereal pest *Spodoptera frugiperda*, the fall armyworm [J]. *NeoBiota*, 2018, 40: 25–50.
- García GC, González MMB, Bautista MN. Patogenicidad de aislamientos de hongos entomopatógenos contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) y *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae) [J]. *Revista Colombiana de Entomología*, 2011, 37 (2): 217–222.
- Hajek AE, St. Leger RJ. Interactions between fungal pathogens and insect hosts [J]. *Annual Review of Entomology*, 1994, 39: 293–322.
- Jiang YY, Liu J, Zhu XM. Analysis on the occurrence dynamics of invasion and future trend of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* in China [J]. *China Plant Protection*, 2019, 39 (2): 33–35. [姜玉英, 刘杰, 朱晓明. 草地贪夜蛾侵入我国的发生动态和未来趋势分析 [J]. *中国植保导刊*, 2019, 39 (2): 33–35]
- Kepler RM, Luangsa-ard JJ, Hywel-Jones NL, et al. A phylogenetically-based nomenclature for Cordycipitaceae (Hypocreales) [J]. *IMA Fungus*, 2017, 8 (2): 335–353.
- 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.
- Lei YY, Lü LH, Wang YH, et al. Pathogenicity study of a strain of *Cordyceps fumosorosea* to *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2020, 42 (1): 68–75. [雷妍圆, 吕利华, 王裕华, 等. 一株玫烟色虫草对草地贪夜蛾的致病性研究 [J]. *环境昆虫学报*, 2020, 42 (1): 68–75]
- Lezama Gutiérrez R, Alatorre Rosas R, Bojalil Jaber LF, et al. Virulence of five entomopathogenic fungi (Hyphomycetes) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) eggs and neonate larvae [J]. *Vedalia Revista Internacional de Control Biológico (Mexico)*, 1996, 3 (1): 35–39.
- Lezama Gutiérrez R, Hamm JJ, Molinaochoa J, et al. Occurrence of entomopathogens of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Mexican States of Michoacán, Colima, Jalisco and Tamaulipas [J]. *Florida Entomologist*, 2001, 84 (1): 23–30.
- Li YP, Zhang S, Wang XJ, et al. Current status of insecticide resistance in *Spodoptera frugiperda* and strategies for its chemical control [J]. *Plant Protection*, 2019, 45 (4): 14–19. [李永平, 张帅, 王晓军, 等. 草地贪夜蛾抗药性现状及化学防治策略 [J]. *植物保护*, 2019, 45 (4): 14–19]
- Li ZZ. History, progress and current status of the application of fungi against pest insects in China [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2015, 31 (5): 699–711. [李增智. 我国利用真菌防治害虫的历史、进展及现状 [J]. *中国生物防治学报*, 2015, 31 (5): 699–711]
- Liao YL, Li CY, Huang SH, et al. Survey on the prevalence and damage of *Spodoptera frugiperda* first invasive in Guangdong [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2019, 41 (3): 497–502. [廖永林, 李传瑛, 黄少华, 等. 草地贪夜蛾首次入侵广东地区发生为害调查 [J]. *环境昆虫学报*, 2019, 41 (3): 497–502]
- Ríos – Díez JD, Saldamando – Benjumea CI. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) strains from central Colombia to two insecticides, methomyl and lambda – cyhalothrin: A study of the genetic basis of resistance [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2011, 104 (5): 1698–1705.
- Rivero-Borja M, Guzmán-Franco AW, Rodríguez-Leyva E, et al. Interaction of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* with chlorpyrifos ethyl and spinosad in *Spodoptera frugiperda* larvae [J]. *Pest Management Science*, 2018, 74 (9): 2047–2052.
- Shah PA, Pell JK. Entomopathogenic fungi as biological control agents [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 61 (5–6): 413–423.
- Thomazoni D, Formentini MA, Alves LFA. Patogenicidade de isolados de fungos entomopatógenos à *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Arquivos do Instituto Biológico*, 2014, 81 (2): 126–133.
- Wang DT, Zhang L, Cheng YX, et al. Larval stage related cannibalism in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* [J/OL]. *Plant Protection*, (2019–10–30) [2019–11–07]. <https://doi.org/10.16688/j.zwbh.2019589>. [王道通, 张蕾, 程云霞, 等. 草地贪夜蛾幼虫龄期对自相残杀行为的影响 [J/OL]. *植物保护*, (2019–10–30) [2019–11–07]. <https://doi.org/10.16688/j.zwbh.2019589>]
- Wang L, Chen KW, Zhong GH, et al. Progress for occurrence and

- management and the strategy of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Smith) [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2019, 41 (3): 479-487. [王磊, 陈科伟, 钟国华, 等. 重大入侵害虫草地贪夜蛾发生危害、防控研究进展及防控策略探讨 [J]. 环境昆虫学报, 2019, 41 (3): 479-487]
- Yang PY, Zhu XM, Guo JF, et al. Strategy and advice for managing the fall armyworm in China [J]. *Plant Protection*, 2019, 45 (4): 1-6. [杨普云, 朱晓明, 郭井菲, 等. 我国草地贪夜蛾的防控对策与建议 [J]. 植物保护, 2019, 45 (4): 1-6]
- Yu SJ, Nguyen SN, Abo-Elghar GE. Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2003, 77 (1): 1-11.
- Zhang L, Jin MH, Zhang DD, et al. Molecular identification of invasive fall armyworm *Spodoptera frugiperda* in Yunnan Province [J]. *Plant Protection*, 2019, 45 (2): 19-24. [张磊, 靳明辉, 张丹丹, 等. 入侵云南草地贪夜蛾的分子鉴定 [J]. 植物保护, 2019, 45 (2): 19-24]
- Zhang LS, Chen HY. Advances in research and application of biological control agents in China [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2014, 30 (5): 581-586. [张礼生, 陈红印. 生物防治作用物研发与应用的进展 [J]. 中国生物防治学报, 2014, 30 (5): 581-586]
- 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. [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 YQ, Hu HF, Fu YF, et al. Isolation and identification of entomopathogenic fungi *Metarhizium rileyi* isolated from *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) [J]. *Plant Protection*, 2019, 45 (5): 65-70. [郑亚强, 胡惠芬, 付玉飞, 等. 草地贪夜蛾莱氏绿僵菌的分离鉴定 [J]. 植物保护, 2019, 45 (5): 65-70]