环境昆虫学报 2022，44（5）：1176－1188
Journal of Environmental Entomology
http：//hjkcxb. alljournals. net
doi：10. 3969/j. issn. 1674－0858. 2022. 05. 12

黄元腾吉，朱文倩，王正贤，黄奕蔓，廖咏梅. 广西南宁市柑橘木虱虫生真菌种类调查［J］. 环境昆虫学报，2022，44（5）：1176－1188.

广西南宁市柑橘木虱虫生真菌种类调查

黄元腾吉，朱文倩，王正贤，黄奕蔓，廖咏梅*
（广西大学农学院，南宁 530004）

摘要：自柑橘木虱 *Diaphorina citri* 体上分离虫生真菌，通过形态特征和 ITS 序列分析，鉴定虫生真菌的种类；通过致病性测定，明确昆虫病原真菌种类。结果发现，自死体柑橘木虱上分离到 18 个虫生真菌菌株，隶属 4 种真菌；自活体上分离到 985 个虫生真菌菌株，隶属 25 种真菌。致病性测定结果发现，仅 4 种真菌对柑橘木虱成虫有致病性，包括刀孢蜡蚧菌 *Lecanicillium psalliotae*、球孢白僵菌 *Beauveria bassiana*、爪哇虫草 *Cordyceps javanica* 和淡紫紫孢菌 *Purpureocillium lilacinum*，该 4 种真菌的分生孢子悬浮液（浓度 5×10^7 个孢子/mL）接种柑橘木虱成虫后 10 d 的累计死亡率分别为 100%、100%、98. 89% 和 43. 33%。其中爪哇虫草仅自死体柑橘木虱上分离到，刀孢蜡蚧菌仅在活体上分离到，球孢白僵菌和淡紫紫孢菌在死体和活体上均被分离到。可见，柑橘木虱活体上的虫生真菌种类丰富。生产上应加强保护和利用昆虫病原真菌，提高其对柑橘木虱的自然抑制力。

关键词：柑橘木虱；虫生真菌；昆虫病原真菌；种类
中图分类号：Q968. 1；S433　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1674－0858（2022）05－1176－13

Investigation on species of entomogenous fungi from *Diaphorina citri* in Nanning, Guangxi

HUANG Yuan-Teng-Ji, ZHU Wen-Qian, WANG Zheng-Xian, HUNAG Yi-Man, LIAO Yong-Mei*
(College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: Entomogenous fungi were isolated from *Diaphorina citri* and their species were identified by morphological characteristics and ITS sequence analysis; the species of entomopathogenic fungi were determined by pathogenicity assay. The results showed that 18 entomogenous fungal strains were isolated from corpse of *D. citri*, belonging to 4 species of fungi; 985 entomogenous fungal strains were isolated from living *D. citri*, belonging to 25 species of fungi. The results of pathogenicity assay showed that only 4 species of fungi were entomopathogenic fungi of *D. citri*, including *Lecanicillium psalliotae*, *Beauveria bassiana*, *Cordyceps javanica* and *Purpureocillium lilacinum*. The cumulative mortality of *D. citri* adult were 100%, 100%, 98. 89% and 43. 33%, 10 days after inoculated with 5×10^7 spores/mL conidia concentration of the 4 entomopathogenic fungi respectively. Among 4 entomopathogenic fungi, *C. javanica* was only isolated from corpse of *D. citri*, *L. psalliotae* was only isolated from living *D. citri*, *B. bassiana* and *P. lilacinum* were isolated from both corpse and living *D. citri*. It is visible that in living *D. citri*, there were abundant entomogenous fungi species. The entomopathogenic fungi should be strengthen in

基金项目：广西科技重大专项（桂科 AA18118046）
作者简介：黄元腾吉，男，硕士，研究方向为植物病理学，E－mail：549835799@ qq. com
*通讯作者 Author for correspondence：廖咏梅，女，博士，教授，主要研究方向为植物病害综合治理，E－mail：liaoym@ gxu. edu. cn
收稿日期 Received：2021－06－17；接受日期 Accepted：2021－12－09

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

protection and utilization in citrus production, to improve the natural inhibition of *D. citri*.

Key words: *Diaphorina citri*; entomogenous fungi; entomopathogenic fungi; species

柑橘黄龙病是世界柑橘生产上最具毁灭性的病害。柑橘感染黄龙病后叶片黄化，果实着色异常、果小畸形，产量低、品质劣，造成巨大的经济损失（林积秀，2018）。至 2009 年，我国柑橘栽培的 19 个省（区）中已有 11 个遭受黄龙病的为害，受害面积占柑橘总栽培面积的 80% 以上（范国成等，2009）。广东省曾因为受到黄龙病和市场竞争的影响，柑橘种植面积从 2011 年 29 万 hm^2 锐减到 2018 年的 23 万 hm^2（乔进超等，2021）。广西的柑橘产业自 2013 年以来进入快速发展的轨道，面积从 23 万 hm^2 发展到 2019 年 55 万 hm^2（陆小平等，2020），占广西水果面积的 41%（高兴，2020）。随着柑橘种植面积的增加，黄龙病的问题也日趋严峻，正在威胁着广西柑橘产业的健康发展。目前，防治柑橘黄龙病的主要措施是推行“三板斧”，即种植无病苗木、防治媒介昆虫柑橘木虱 *Diaphorina citri* 和砍伐病树，其中防治柑橘木虱主要通过喷施化学农药。在国家实施农药、化肥施用量“双减”措施及推行“绿色植保”理念的形势下，推广生物防治柑橘木虱将是今后发展的方向，其中利用柑橘木虱的昆虫病原真菌防治柑橘木虱将是生物防治的重要措施之一。

虫生真菌（entomogenous fungi）是指寄生在昆虫（或其他节肢动物）虫体上的真菌。能够侵入昆虫体内寄生、导致昆虫发病致死的虫生真菌称为昆虫病原真菌（entomopathogenic fungi）（王军等，2021）。已报道的柑橘木虱昆虫病原真菌有：金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae*、球孢白僵菌 *Beauveria bassiana*（同义名：球孢虫草 *Cordyceps bassiana*）、玫烟色虫草 *Cordyceps fumosorosea*（同义名：玫烟色棒束孢 *Isaria fumosorosea*）、桔形被毛孢 *Hirsutella citriformis*、刺束梗孢属 *Akanthomyces* 之一种：*Akanthomyces lecanii*（同义名：蜡蚧轮枝菌 *Lecanicillium lecanii*）、尖孢枝孢菌 *Cladosporium oxysporum*（Lezama-Gutiérrez *et al.*，2012）；爪哇虫草 *Cordyceps javanica*（同义名：爪哇棒束孢 *Isaria javanica*）（Gallou *et al.*，2016）；淡紫紫孢菌 *Purpureocillium lilacinum*（杜丹超等，2015）；*Akanthomyces attenuatus*（同义名：渐狭蜡蚧菌 *Lecanicillium attenuatum*）、刀孢蜡蚧菌 *Lecanicillium psalliotae*（鹿连明等，2016）；宛氏拟青霉 *Paecilomyces varioti*（宋晓兵等，2018）。其中，国外已有利用金龟子绿僵菌、球孢白僵菌、玫烟色虫草、桔形被毛孢和 *Akanthomyces lecanii* 防治柑橘木虱的报道（代晓彦等，2014）。

本研究在南宁市广西大学多功能植物标本园的九里香 *Murraya paniculata* 绿篱上系统调查柑橘木虱的自然死亡情况，并分离柑橘木虱活体及死体上的虫生真菌，通过形态学和真菌核糖体基因 ITS（Internal transcribed spacers，内转录间隔区）序列分析，鉴定分离到的虫生真菌的种类，分析柑橘木虱虫生真菌种类多样性；测定重要虫生真菌对柑橘木虱的致病性，了解柑橘木虱上昆虫病原真菌的种类，为利用昆虫病原真菌防治柑橘木虱提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　柑橘木虱自然死亡的调查

2019 年 1 月至 2019 年 12 月，在广西大学多功能植物标本园，系统调查九里香绿篱上自然死亡的柑橘木虱，观察死亡柑橘木虱的体态特征。调查的九里香绿篱面积约为 20 m^2，每月调查 1 次。每月定期修剪九里香绿篱，其高度一般在 1 m 左右，从未喷施农药。

1.2　柑橘木虱虫生真菌的分离

1.2.1　自然死亡柑橘木虱上虫生真菌的分离

将从九里香绿篱上采集到的自然死亡柑橘木虱分别装入无菌 1.5 mL 离心管中，每管装一头柑橘木虱虫尸。将柑橘木虱虫尸移到一次性培养皿中，以湿润的无菌滤纸保湿，置于温度 27 ± 1℃、光周期为 12 h（光照）∶12 h（黑暗）的恒温光照培养箱中培养，每 12 h 观察一次。当虫尸表面长出菌丝体，即在超净工作台上用解剖针挑取少量菌丝体，接种到马铃薯葡萄糖琼脂（Potato Dextrose Agar，PDA）培养基上，于温度 27 ± 1℃、

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

光周期为 12 h（光照）∶12 h（黑暗）的恒温光照培养箱中培养，待菌落直径达 2 ~ 3 cm 时，挑取菌落边缘菌丝体移到新的 PDA 培养基上进行纯化，经3 次纯化后移到斜面培养基上培养 2 d，置于 4℃冰箱中保存。

1.2.2 活体柑橘木虱上虫生真菌的分离

采集活体柑橘木虱，装入小型自封袋中，将空气排出，置于室内 24 h，使柑橘木虱窒息死亡。在超净工作台上，将已窒息死亡的柑橘木虱置于无菌 1.5 mL 离心管中，用无菌水冲洗 5 次，并以无菌滤纸吸干体表水分。用灭菌镊子将表面清洗后的柑橘木虱虫体置于 PDA 培养基上，每个培养皿中放置柑橘木虱 5 头。培养条件和真菌的纯化方法同 1.2.1。

1.3 柑橘木虱虫生真菌的种类鉴定

挑取纯化后的真菌菌丝块制成临时玻片，于光学显微镜下观察其形态特征，进行初步归类。用真菌基因组 DNA 提取试剂盒（Biospin Fungus Genomic DNA Extraction Kit，杭州博日科技有限公司）提取形态特征相同真菌组的代表菌株的基因组 DNA，用引物对 ITS1/ITS4（ITS1：5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′；ITS4：5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′）对待测菌株的基因组 DNA 中的 ITS 进行 PCR 扩增。PCR 体系：模板 DNA 6.0 μL（20 ng/μL）、正反向引物各 1.5 μL（10 μmol/L）、2 × Dream Taq Green PCR Master Mix 20 μL，用 ddH_2O 补足至 40 μL。PCR 扩增程序：94℃预变性 5 min；94℃变性 30 s，55℃退火 30 s（部分菌株 49℃退火 30 s），72℃延伸 1 min，共 30 个循环；72℃末次延伸 5 min。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物，在凝胶成像系统中观察，如 PCR 产物为单一清晰条带，则直接送广州擎科生物科技有限公司测序，所获序列在 NCBI 网站上的 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对分析。同时在 GenBank 中下载同属的多种真菌的 ITS 序列，用 MEGA 6.0 软件的邻接法（Neighbor-joining method）构建系统发育树，Bootstrap 值设置为 1 000。

1.4 虫生真菌对柑橘木虱的致病性测定

将已完成种类鉴定的代表菌株对柑橘木虱进行致病性测定。在高 13.5 cm、口径 8 cm、杯底直径 6 cm 并有 3 个透水孔的透明塑料杯中加入 1/4 体积的基质（珍珠岩∶蛭石 = 1∶4 的体积比混匀），将具有 5 ~ 7 张叶片的九里香实生苗移植到基质中，再在基质表面平铺一层白色吸水纸。将移栽了九里香幼苗的塑料杯放置在直径 9 cm 的塑料培养皿中，在培养皿中加入适量改良版霍格兰营养液（Hoagland's solution）（陈超等，2014），供九里香生长的营养需要。

在温室的九里香上捕捉柑橘木虱成虫，装入自封袋中，每个袋装 30 头，置于装有冰块的泡沫箱中降低其活动能力。将活动能力弱的柑橘木虱成虫放在冰块上铺设的双层纱布上，喷洒浓度为 5.0×10^7 个孢子/mL 的待测菌株分生孢子悬浮液，然后将纱布倒扣于种有九里香苗的塑料杯口，并用橡皮筋将纱布固定。室温下静置 30 min，待柑橘木虱恢复活力并自行爬（跳）到九里香叶片上时，更换新的纱布，并用带孔的培养皿盖盖住杯口保持杯内高湿环境。置于温度 27℃、光照周期为 12 h（光照）∶12 h（黑暗）、相对湿度 70% ~ 85% 的恒温光照培养箱中，每 24 h 观察 1 次柑橘木虱，接种后 48 h 移走培养皿盖，连续观察 10 d。以喷施 0.1% 吐温-80 溶液为对照组，每个处理设置 3 个重复。

1.5 试验数据的统计分析

用统计软件 SPSS 19.0 中的 Dunnett-t 法检验致病性测定中各处理与对照间柑橘木虱累计死亡率的差异显著性，$\alpha = 0.05$。

柑橘木虱累计死亡率的计算公式为：

$$\text{累计死亡率}(\%) = \frac{\text{柑橘木虱死亡数量}}{\text{柑橘木虱总数}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 柑橘木虱成虫的自然死亡

在 12 个月的调查结果中发现，在九里香绿篱（图 1-A）上，仅 6 个月（1 月、3 月、6 月、7 月、11 月和 12 月）发现有自然死亡的柑橘木虱成虫，共采集到 34 头虫尸。其中，在绿篱下层（自地面向上 0 ~ 50 cm 高度）采集到的虫尸 24 头，占 70.6%，其中 15 头（62.5%）虫尸躺在叶面（图 1-C），9 头（37.5%）虫尸挂在叶片、叶柄或成

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

熟枝条上（图 1-B）。在绿篱上层（自地面向上 51 ~ 100 cm 高度）采集到的虫尸 10 头，占 29.4%，其中 8 头（80%）躺在叶面，2 头（20%）挂在植株上。躺在叶面的虫尸呈侧躺或腹面朝上仰躺姿态，挂在植株上的虫尸与植株有一定的角度，类似活虫姿态，少数虫尸翅膀展开。在 34 头虫尸中，仅有 12 头虫尸上有霉层，占 35%；22 头虫尸上无霉层，占 65%。

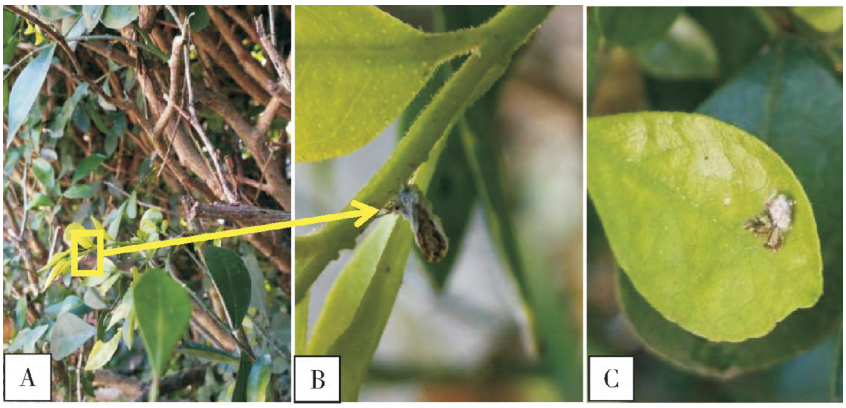


图 1　自然死亡的柑橘木虱

Fig. 1　Natural death of *Diaphorina citri*

注：A，九里香绿篱及柑橘木虱虫尸；B，柑橘木虱虫尸类似活虫姿态，表面长有霉层；C，柑橘木虱虫尸躺在叶面上，表面长有霉层。Note：A，Hedge of *Murraya paniculata* and corpse of *D. citri*；B，Posture of corpse like a living *D. citri* with fungi mycelia on surface；C，Corpse of *D. citri* lying on leaf with fungi mycelia on surface.

2.2　柑橘木虱虫生真菌的分离与种类鉴定

2.2.1　自然死亡柑橘木虱虫生真菌的分离与种类鉴定

从自然死亡的柑橘木虱虫尸上分离获得 18 株真菌，经形态特征观察和 ITS 序列分析，18 株真菌分为 4 种，其中球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 8 株，爪哇虫草 *Cordyceps javanica* 5 株，枝状枝孢菌 *Cladosporium cladosporioides* 4 株，淡紫紫孢菌 *Purpureocillium lilacinum* 1 株。除了枝状枝孢菌，其他 3 种真菌均已被报道为柑橘木虱的昆虫病原真菌。

2.2.2　活体柑橘木虱虫生真菌的分离与种类鉴定

在活体柑橘木虱上分离到菌落特征一致的菌株有 3 个以上的真菌菌株共 985 个，根据菌落形态特征进行归类，结合代表菌株的 ITS 序列分析确定该类菌株的种类。结果发现，985 株真菌分为 25 种，其中仅有 3 种（刀孢蜡蚧菌 *Lecanicillium psalliotae*、淡紫紫孢菌 *Purpureocillium lilacinum* 和球孢白僵菌 *Beauveria bassiana*）被报道为柑橘木虱的昆虫病原真菌，8 种被报道为其他农业害虫的病原真菌，其他种类未见被报道为农业害虫的病原真菌，详见表 1。

2.3　分离获得的虫生真菌对柑橘木虱成虫的致病力测定

用分离获得的虫生真菌分 5 批进行对柑橘木虱成虫的致病性测定，结果见表 2。

在供试的 12 种柑橘木虱虫生真菌中，仅 4 种（刀孢蜡蚧菌 7r163 菌株、球孢白僵菌 n67 菌株、爪哇虫草 n70 菌株及淡紫紫孢菌 6z2 菌株）对柑橘木虱有致病性（图 2），柑橘木虱成虫的累计死亡率分别为 100%、100%、98.89% 及 43.33%，且均与对照具有显著差异（表 2），其他虫生真菌对柑橘木虱无致病性。说明自柑橘木虱活体上分离到的虫生真菌，绝大多数种类对柑橘木虱是无致病性的。

2.4　4 种柑橘木虱昆虫病原真菌的形态特征及 ITS 序列分析

2.4.1　刀孢蜡蚧菌 7r163 菌株的形态特征及 ITS 序列

在 PDA 培养基上，菌株 7r163 菌落正面纯白色，可见不明显的同心轮纹，反面浅黄色，培养 10 d 菌落直径为 33.30 mm。分生孢子梗菌丝状，无分枝，分生孢子头状聚生，遇水易脱落散开。分生孢子无色，两端渐狭呈微弯月形，大小（4.59 ~ 10.80 μm）×（1.81 ~ 3.38 μm）（图 3）。

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 1 从活体柑橘木虱上分离到菌落特征一致的菌株 3 个以上的虫生真菌的种类及其已报道的寄主种类

Table 1 Species and host species reported of entomogenous fungi more than three strains with consistent colony characteristics obtained isolated from living *Diaphorina citri*

序号 No.	种类 Species	自活体成虫上分离到的真菌菌株数 Strain number of fungi isolated from living adults *D. citri*	自活体若虫上分离到的真菌菌株数 Strain number of fungi isolated from living nymphs *D. citri*	菌株数 Total strain number	已报道的其他寄主种类 Other host species reported	参考文献 Reference
1	★枝状枝孢菌 *Cladosporium cladosporioides*	239	267	506	柑橘全爪螨 *Panonychus citri*	王娟,2017
2	木贼镰刀菌 *Fusarium equiseti*	58	50	108	–	
3	棘孢曲霉 *Aspergillus aculeatus*	78	6	84	–	
4	★桔青霉 *Penicillium citrinum*	53	4	57	*Pteroptyx bearni*(鞘翅目 Coleoptera 萤科 Lampyridae 的一种昆虫)	Foo *et al.*,2017
5	★草酸青霉 *Penicillium oxalicum*	33	22	55	地中海实蝇 *Ceratias capitata*	El-Akhdar *et al.*,2009
6	曲霉属的一种 *Aspergillus* sp.	20	0	20	–	
7	※刀孢蜡蚧菌 *Lecanicillium psalliotae*	0	19	19	南方根结线虫 *Meloidogyne incognita*	陈德鑫等,2012
8	★黄曲霉 *Aspergillus flavus*	16	0	16	瓜实蝇 *Bactrocera cucurbitae*	杨叶等,2016
9	※淡紫紫孢菌 *Purpureocillium lilacinum*	4	11	15	南方根结线虫 *Meloidogyne incognita*	Dahlina *et al.*,2019
10	*Pseudopithomyces chartarum*	10	5	15	–	
11	出芽短梗霉菌 *Aureobasidium pullulans*	10	2	12	–	
12	*Stagonosporopsis cucurbitacearum*	6	5	11	–	
13	★砖红镰刀菌 *Fusarium lateritium*	5	4	9	桔蚜 *Aphis citricidus*	宋漳,2001
14	*Diaporthe discoidispora*	7	1	8	–	

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

续表 1 Continued table 1

序号 No.	种类 Species	自活体成虫上分离到的真菌菌株数 Strain number of fungi isolated from living adults *D. citri*	自活体若虫上分离到的真菌菌株数 Strain number of fungi isolated from living nymphs *D. citri*	菌株数 Total strain number	已报道的其他寄主种类 Other host species reported	参考文献 Reference
15	小孢拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis microspora*	8	0	8	–	
16	菌核青霉 *Penicillium sclerotiorum*	8	0	8	–	
17	*Penicillium mallochii*	6	0	6	–	
18	*Ectophoma multirostrata*	3	2	5	–	
19	*Penicillium brocae*	4	0	4	–	
20	高粱附球菌 *Epicoccum sorghinum*	1	3	4	–	
21	※球孢白僵菌 *Beauveria bassiana*	3	0	3	红棕象甲 *Rhynchophorus ferrugineus*	Gindin *et al.*,2006
22	★烟曲霉 *Aspergillus fumigatus*	2	1	3	大豆孢囊线虫 *Heterodera glycines*	陈秀菊,2019
23	★链格孢 *Alternaria alternata*	3	0	3	黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*	Christias *et al.*,2001
24	稻黑孢 *Nigrospora oryzae*	3	0	3	–	
25	★甘蓝链格孢 *Alternaria brassicicola*	3	0	3	非洲茎螟 *Eldana saccharina*	Baidoo & Ackuaku,2011
菌株数小计 Total strain number				583	402	985

注：※已被报道为柑橘木虱的病原真菌；★已被报道为其他农业害虫的病原真菌；– 未见报道为其他农业害虫的病原真菌。Note：※Entomopathogenic fungi reported from *Diaphorina citri*；★Pathogenic fungi reported from other agricultural pests；– Have not been reported as a pathogenic fungus of other agricultural pests.

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2 接种虫生真菌后柑橘木虱成虫的累计死亡率

Table 2 Cumulative mortality of *Diaphorina citri* after inoculation entomogenous fungi isolated

处理 Treatment	真菌种类及菌株 Fungi species and strains	累计死亡率（%） Accumulative mortality		
		2 d	6 d	10 d
处理 1 Treatment 1	球孢白僵菌 *Beauveria bassiana*（n67）	1.11 ± 1.92	100.00 ± 0.00*	100.00 ± 0.00*
	爪哇虫草 *Cordyceps javanica*（n70）	2.22 ± 1.92	97.78 ± 3.85*	98.89 ± 1.92*
	CK1	1.11 ± 1.92	3.33 ± 3.33	6.67 ± 6.67
处理 2 Treatment 2	刀孢蜡蚧菌 *Lecanicillium psalliotae*（7r163）	24.44 ± 3.85*	100.00 ± 0.00*	100.00 ± 0.00*
	淡紫紫孢菌 *Purpureocillium lilacinum*（6z2）	2.22 ± 1.92	20.00 ± 6.67*	43.33 ± 17.64*
	CK2	0.00 ± 0.00	1.11 ± 1.92	4.44 ± 5.09
处理 3 Treatment 3	枝状枝孢霉 *Cladosporium cladosporioides*（n74）	8.89 ± 9.62	12.22 ± 6.94	16.67 ± 8.82
	CK3	5.56 ± 5.09	11.11 ± 5.09	16.67 ± 5.77
处理 4 Treatment 4	草酸青霉 *Penicillium oxalicum*（6r5）	4.44 ± 1.92	6.67 ± 0.00	8.89 ± 1.92
	棘孢曲霉 *Aspergillus aculeatus*（6r2）	0.00 ± 0.00	3.33 ± 5.77	4.44 ± 5.09
	CK4	0.00 ± 0.00	1.11 ± 1.92	7.78 ± 5.09
处理 5 Treatment 5	桔青霉 *Penicillium citrinum*（7r021）	3.33 ± 0.00	7.78 ± 7.70	10.00 ± 8.82
	Penicillium mallochii（7c063）	0.00 ± 0.00	2.22 ± 3.85	6.67 ± 3.33
	黄曲霉 *Aspergillus flavus*（7c074）	0.00 ± 0.00	1.11 ± 1.92	5.56 ± 1.92
	烟曲霉 *Aspergillus fumigatus*（7c044）	1.11 ± 1.92	5.56 ± 1.92	6.67 ± 3.33
	出芽短梗霉菌 *Aureobasidium pullulans*（7c055）	3.33 ± 3.33	8.89 ± 5.09	11.11 ± 6.94
	CK5	2.22 ± 3.85	5.56 ± 5.09	7.78 ± 3.85

注：用 SPSS 19.0 软件进行数据统计。数据为平均值 ± 标准差。* 该数据与该处理中的 CK 间存在显著差异，$P < 0.05$。Note: Data statistics with SPSS 19.0 software. Data in table 3 indicated means ± SD, Data with * indicated with significant difference between treatment and corresponding CK ($P < 0.05$).

菌株 7r163 的 ITS 序列 618 bp（MZ356504），BLAST 比对结果与刀孢蜡蚧菌 *Lecanicillium psalliotae*（KC881072.1）同源性为 98%。下载蜡蚧属 *Lecanicillium* 的主要真菌种类构建系统发育树，结果表明，菌株 7r163 与刀孢蜡蚧菌 *Lecanicillium psalliotae*（KC881072.1）聚在同一分支。结合形态特征和 ITS 序列的分析结果，确定菌株 7r163 为刀孢蜡蚧菌 *Lecanicillium psalliotae*（图 4）。

2.4.2 球孢白僵菌 n67 菌株的形态特征及 ITS 序列

在 PDA 培养基上，菌株 n67 菌落正面为白色，背面淡黄色，质地紧密，菌落中部菌丝较厚，培养 10 d 菌落直径为 37.11 mm。分生孢子梗顶部分叉或不分叉，产孢细胞直接聚生于分生孢子梗顶端或轮生于近顶端。分生孢子无色，圆球形或近球形，直径 1.39 ~ 2.55 μm（图 5）。

菌株 n67 的 ITS 序列 569 bp（MZ356505），BLAST 比对结果与球孢白僵菌 *Beauveria bassiana*（MT529274.1）的同源性为 99.82%。下载白僵菌属 *Beauveria* 的主要真菌种类构建系统发育树，结果表明，菌株 n67 与球孢白僵菌 *Beauveria bassiana*（HQ880761.1）聚在同一分支。结合形态特征和 ITS 序列的分析结果，确定菌株 n67 为球孢白僵菌 *Beauveria bassiana*（图 6）。

2.4.3 爪哇虫草 n70 菌株的形态特征及 ITS 序列

在 PDA 培养基上，菌株 n70 菌落正面中间淡紫色，外围一圈呈白色，背面淡黄色。培养第 3 天即产生分生孢子，第 10 天菌落直径为 24.14 mm。分生孢子梗顶端和近顶端多有分叉，并密集着生多个顶部细长的保龄球形或容量瓶形瓶梗细胞。分生孢子长椭圆形，无色或淡粉色，大小为（3.64 ~ 5.76 μm）×（1.63 ~ 2.43 μm），串生于产孢细胞顶部形成长链（图 7）。

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

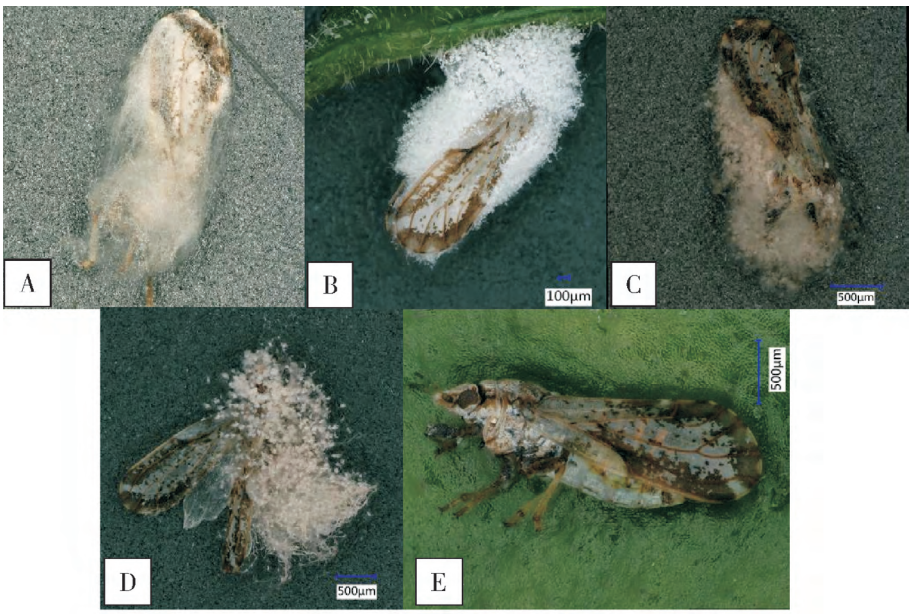


图 2　昆虫病原真菌接种柑橘木虱成虫后的症状

Fig. 2　Symptoms of *Diaphorina citri* adult inoculated by entomopathogenic fungi

注：A，刀孢蜡蚧菌 7r163 菌株接种柑橘木虱成虫后 12 d；B，球孢白僵菌 n67 菌株接种柑橘木虱成虫后 10 d；C，爪哇虫草 n70 菌株接种柑橘木虱成虫后 12 d；D，淡紫紫孢菌 6z2 菌株接种柑橘木虱成虫后 12 d；E，未接种昆虫病原真菌的柑橘木虱成虫活体。Note：A，*D. citri* adult after inoculated by *Lecanicillium psalliotae* strain 7r163 for 12 days；B，*D. citri* adult after inoculated by *Beauveria bassiana* strain n67 for 10 days；C，*D. citri* adult after inoculated by *Cordyceps javanica* strain n70 for 12 days；D，*D. citri* adult after inoculated by *Purpureocillium lilacinum* strain 6z2 for 12 days；E，Living *D. citri* adult without entomopathogenic fungi inoculation.

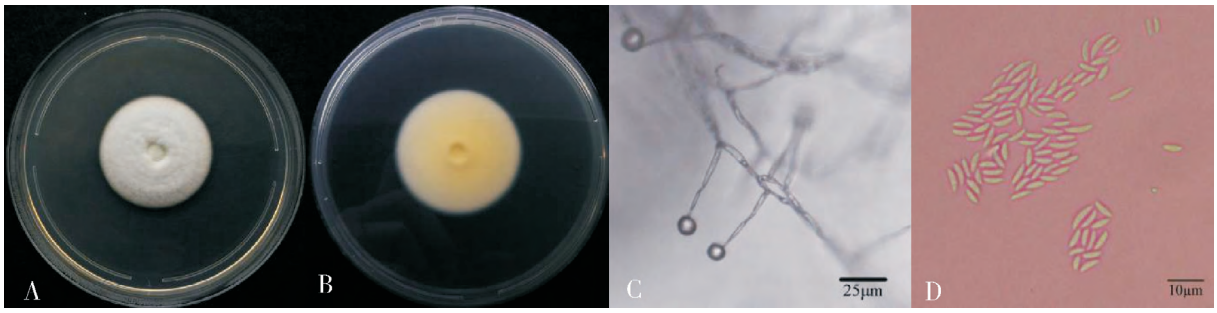


图 3　刀孢蜡蚧菌 7r163 菌株的形态特征

Fig. 3　Morphological characteristics of *Lecanicillium psalliotae* strain 7r163

注：A～B，在 PDA 培养基上培养 12d 菌落（A，菌落正面；B，菌落背面）；C，分生孢子梗及头状聚生的分生孢子；D，分生孢子。Note：A～B，Colony on PDA for 12 days（A，Obverse side of colony；B，Reverse side of colony）；C，Conidiophores and conidia capitates aggregation at the apex of conidiophores；D，Conidia.

菌株 n70 的 ITS 序列 589 bp（MZ356506），BLAST 比对结果与爪哇虫草 *Cordyceps javanica* FRIM1513 菌株（MT801895.1）的同源性为 99.83%。下载虫草属 *Cordyceps* 的主要真菌种类构建系统发育树，结果表明，菌株 n70 与爪哇虫草 *Cordyceps javanica* CBS134.22 模式菌株（MH854719.1）聚在同一分支。结合形态特征和 ITS 序列的分析结果，确定菌株 n70 为爪哇虫草 *Cordyceps javanica*（图 8）。

2.4.4　淡紫紫孢菌 6z2 菌株的形态特征及 ITS 序列

在 PDA 培养基上，菌株 6z2 菌落淡紫色，表

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

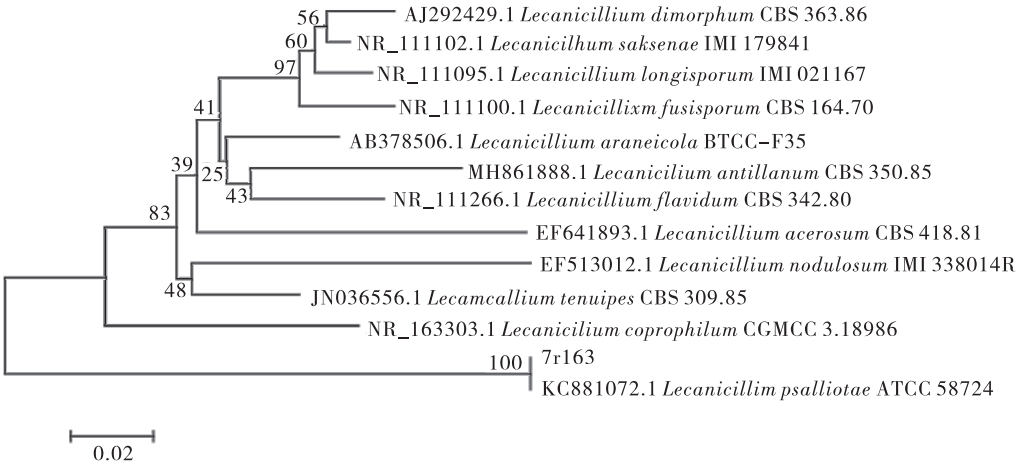


图 4 菌株 7r163 与蜡蚧属的 12 种真菌基于 ITS 序列构建的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of strain 7r163 and 12 species fungi in *Lecanicillium* based on ITS sequence

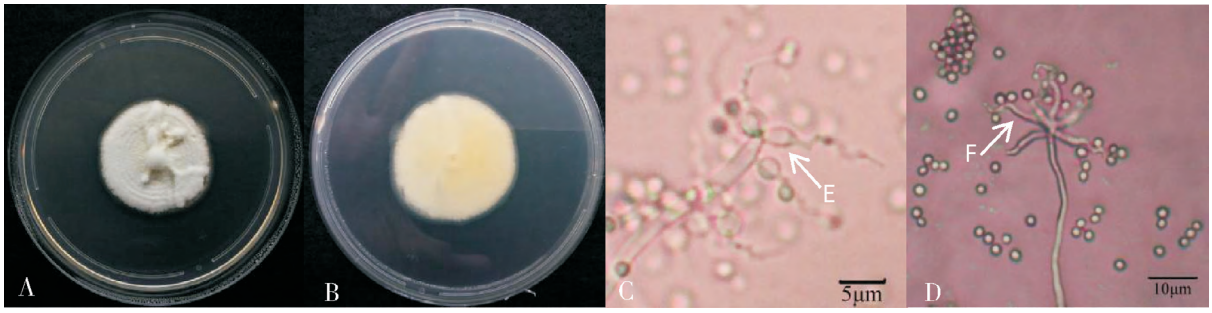


图 5 球孢白僵菌 n67 菌株的形态特征

Fig. 5 Morphological characteristics of *Beauveria bassiana* strain n67

注：A～B，在 PDA 培养基上培养 12 d 菌落（A，菌落正面；B，菌落背面）；C～D，分生孢子梗及分生孢子；E～F，产孢细胞。Note：A～B，Colony on PDA for 12 days（A，Obverse side of colony；B，Reverse side of colony）；C～D，Conidiophores and conidia；E～F，Conidiogenous cells.

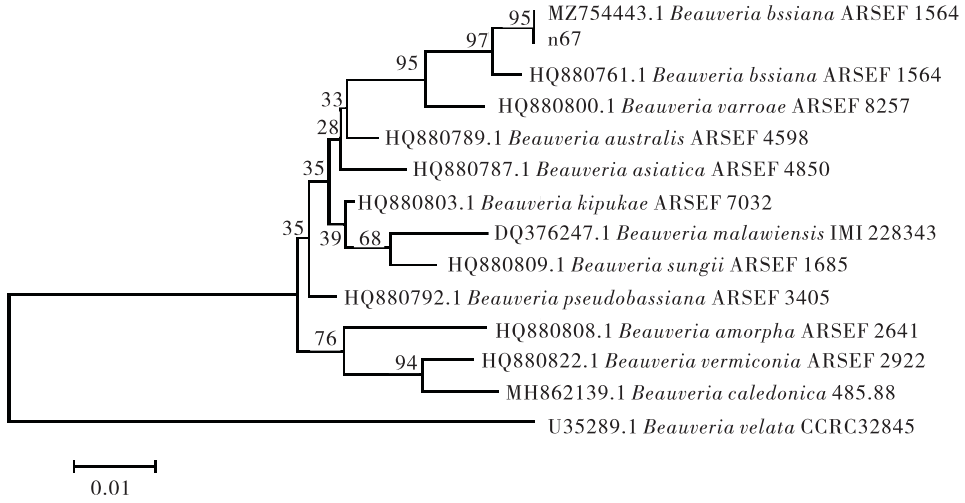


图 6 菌株 n67 与白僵菌属的 13 种真菌基于 ITS 序列构建的系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree of strain n67 and 13 species fungi in *Beauveria* based on ITS sequence

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

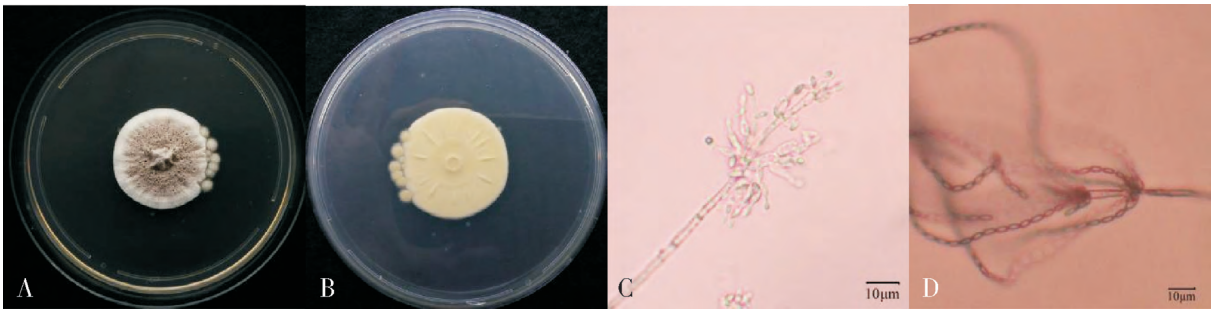


图 7　爪哇虫草 n70 菌株的形态特征

Fig. 7　Morphological characteristics of *Cordyceps javanica* strain n70

注：A～B，在 PDA 培养基上培养 12 d 菌落（A，菌落正面；B，菌落背面）；C，分生孢子梗及产孢细胞；D，串生的分生孢子。Note：A～B，Colony on PDA for 12 days（A，Obverse side of colony；B，Reverse side of colony）；C，Conidiophores and conidiogenous cells；D，Conidia stringing together.

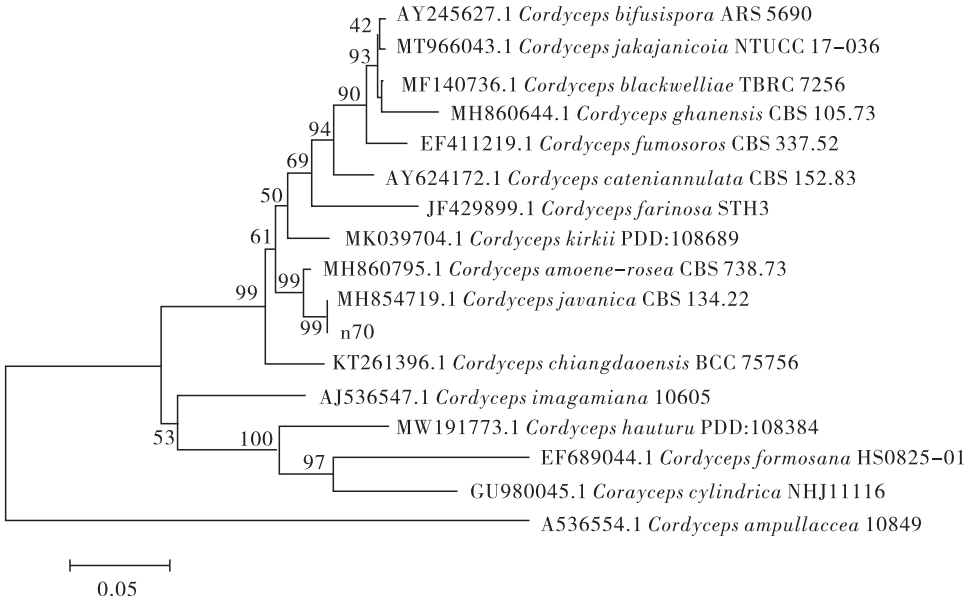


图 8　菌株 n70 与虫草属的 16 种真菌基于 ITS 序列构建的系统发育树

Fig. 8　Phylogenetic tree of strain n70 and 16 species fungi in *Cordyceps* based on ITS sequence

面细颗粒状，有同心轮纹；培养第 7 天即产生大量分生孢子，第 10 天菌落直径为 48.71 mm；分生孢子梗顶部不分叉或分叉，瓶梗细胞 1～5 个，长 8～13 μm，轮生或对生于分生孢子梗近顶部，瓶梗细胞底部膨大、近顶部渐收变细长呈保龄球状或烧瓶状；分生孢子单胞偶有双胞，无色，圆球形或椭圆形，大小为（2.42～3.34 μm）×（1.98～2.75 μm）（图 9）。

6z2 菌株的 ITS 序列 594 bp（MZ356507），BLAST 比对与淡紫紫孢菌 *Purpureocillium lilacinum*（MG148343.1）同源性为 99.49%。下载 *Purpureocillium* 属的主要真菌种类构建系统发育树，结果表明，菌株 6z2 与淡紫紫孢菌 *Purpureocillium lilacinum*（MG148343.1）聚在同一分支。结合形态特征和 ITS 序列的分析结果，确定菌株 6z2 为淡紫紫孢菌 *Purpureocillium lilacinum*（图 10）。

3　结论与讨论

自然界中柑橘木虱虫体上有多种昆虫病原真菌，导致柑橘木虱的自然死亡。本研究针对九里香绿篱上的柑橘木虱虫生真菌的分离结果发现，在自然死亡的柑橘木虱虫体上分离到的 18 个真菌菌株，隶属 4 种真菌，包括球孢白僵菌 *Beauveria*

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

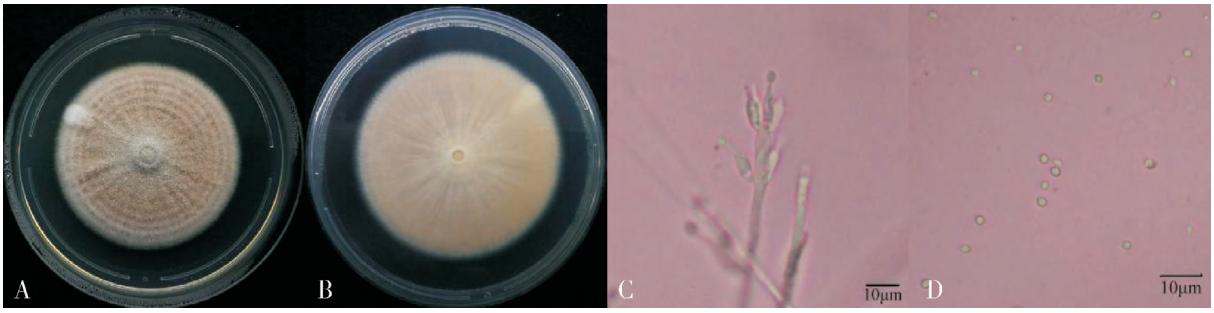


图 9 淡紫紫孢菌 6z2 菌株的形态特征

Fig. 9 Morphological characteristics of *Purpureocillium lilacinum* strain 6z2

注：A ~ B，在 PDA 培养基上培养 12 d 菌落（A，菌落正面；B，菌落背面）；C，分生孢子梗及产孢细胞；D，分生孢子。Note：A ~ B，Colony on PDA for 12 days（A，Obverse side of colony；B，Reverse side of colony）；C，Conidiophores and conidiogenous cells；D，Conidia.

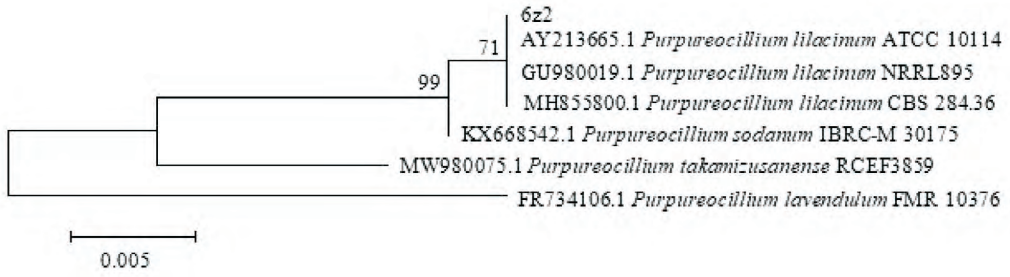


图 10 菌株 6z2 与 *Purpureocillium* 属的 6 种真菌基于 ITS 序列构建的系统发育树

Fig. 10 Phylogenetic tree of strain 6z2 and 6 species fungi in *Purpureocillium* based on ITS sequence

bassiana、爪哇虫草 *Cordyceps javanica*、枝状枝孢菌 *Cladosporium cladosporioides* 和淡紫紫孢菌 *Purpureocillium lilacinum*，除了枝状枝孢菌，其他 3 种真菌均已被报道为柑橘木虱的昆虫病原真菌。从活体柑橘木虱虫体上分离到的 985 个真菌菌株中，隶属 25 个种类，其中仅有 3 种（刀孢蜡蚧菌 *Lecanicillium psalliotae*、淡紫紫孢菌和球孢白僵菌）为柑橘木虱的昆虫病原真菌，有 8 种被报道为其他农业害虫的病原真菌，但从活体柑橘木虱上未分离到柑橘木虱病原真菌 – 爪哇虫草。致病性测定的结果发现，在 12 种柑橘木虱虫生真菌中，仅 4 种（刀孢蜡蚧菌 7r163 菌株、球孢白僵菌 n67 菌株、爪哇虫草 n70 菌株及淡紫紫孢菌 6z2 菌株）对柑橘木虱有致病性，柑橘木虱成虫的累计死亡率分别为 100%、100%、98.89% 及 43.33%，均与其相应的对照有显著差异。可见，自柑橘木虱死体成虫上分离到的 4 种真菌中有 3 种为柑橘木虱病原真菌，但自柑橘木虱活体上分离到的虫生真菌，绝大多数种类对柑橘木虱是无致病性的。

自死体柑橘木虱上分离到的 18 株虫生真菌中，8 株为球孢白僵菌，5 株为爪哇虫草，4 株为枝状枝孢菌，1 株为淡紫紫孢菌。从活体柑橘木虱上分离到的 985 株虫生真菌中，506 株为枝状枝孢菌，19 株为刀孢蜡蚧菌，15 株为淡紫紫孢菌。致病性测定结果表明，分离数量最多的枝状枝孢菌对柑橘木虱成虫无致病性。

据报道，枝状枝孢菌是植物的内生菌，可产生有益植物生长的活性物质。Yehia *et al.*（2020）报道，枝状枝孢菌是蒺藜科 Zygophyllaceae 驼蹄瓣属 *Zygophyllum* 中一种植物 *Zygophyllum mandavillei* 的内生菌，该菌的次生代谢产物对多种植物病原细菌和真菌均有抗菌活性。Qin *et al.*（2016）研究表明，用海岸植物盐地碱蓬 *Suaeda salsa* 种子中的内生菌枝状枝孢菌接种寄主种子，可提高其发芽率。枝状枝孢菌也是植物病原菌，Hassan *et al.*（2020）认为，枝状枝孢菌可引起葡萄果实的枝孢菌腐烂病，对葡萄果实产量和质量产生巨大影响。此外，作为植物内生菌，枝状枝孢菌还有其他的

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

生物学功能，如枝状枝孢菌作为一种海藻 *Sargassumwightii* 的内生菌（*Manjunath et al*，2017），可生物合成金纳米粒子。枝状枝孢菌是柑橘木虱活体上最丰富的虫生真菌，其生物学功能值得进一步研究。

在分离到的对柑橘木虱有致病性的 4 种昆虫病原真菌中，球孢白僵菌和淡紫紫孢菌在死体和活体柑橘木虱体上均可分离到，而爪哇虫草仅在死体上分离到，刀孢蜡蚧菌仅在活体若虫上分离到。可见，昆虫病原真菌可潜伏在健康虫体上，其导致柑橘木虱发病死亡的条件，需要进一步研究。

自然界中，除了昆虫病原真菌，柑橘木虱还有多种捕食或寄生天敌。调查中仅采集到 34 头自然死亡的柑橘木虱成虫，其原因可能是柑橘木虱死亡后虫尸掉落到地面草丛中，难以被发现，或者在成虫阶段已被捕食性天敌捕食了；调查中发现部分虫尸有残缺，可能是在死亡前后被瓢虫等捕食性天敌咬食；多数柑橘木虱若虫体上有寄生蜂羽化孔，由于若虫体内的营养物质已被寄生蜂吸收，调查过程很少见到死亡若虫体表长出霉菌的现象。所调查的九里香绿篱，从未喷施过化学药剂，因此，分离到的柑橘木虱昆虫病原真菌的种类是有代表性的。调查中还发现柑橘木虱的捕食性天敌，如蜘蛛、瓢虫及草蛉等，寄生性天敌如亮腹釉小蜂 *Tamarixia radiata* 和阿里食虱跳小蜂 *Diaphorencyrtus aligarhensis*，生产上应充分保护和利用柑橘木虱的天敌，提高天敌对柑橘木虱的自然控制力，促进柑橘绿色产业的健康发展。

参考文献（References）

Baidoo PK, Ackuaku SK. The effects of spore concentrations of entomogenous fungi on larval mortality and development of the maize stem borer *Eldana saccharina* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. *Journal of Applied Biosciences*, 2011, 1 (47): 3221 – 3229.

Chen C, Zhao LL, Ren DH, *et al*. Effects of different nutrition solution on growth of vetiver grass [J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2014, 42 (5): 86 – 88. [陈超, 赵丽丽, 任登鸿, 等. 不同营养液对香根草生长的影响 [J]. 贵州农业科学, 2014, 42 (5): 86 – 88]

Chen DX, Xu JL, Cao JZ, *et al*. Biocontrol of tobacco root – knot nematodes by egg – parasitic fungus *Lecanicillium psalliotae* [J]. *Chinese Tobacco Science*, 2012, 33 (4): 65 – 69. [陈德鑫, 许家来, 曹君正, 等. 卵寄生真菌刀孢蜡蚧菌对烟草根结线虫的生物防治 [J]. 中国烟草科学, 2012, 33 (4): 65 – 69]

Chen XJ. Screening, Identification and Mode of Action of Biocontrol Fungi to Soybean Cyst Nematode [D]. Lanzhou: Gansu Agriculture University, 2019. [陈秀菊. 大豆孢囊线虫生防真菌的筛选、鉴定及其作用方式 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2019]

Christias C, Hatzipapas P, Dara A, *et al*. *Alternaria alternata*, a new pathotype pathogenic to aphids [J]. *Biocontrol*, 2001, 46 (1): 105 – 124.

Dahlina P, Edera R, Consolia E, *et al*. Integrated control of *Meloidogyne incognita* in tomatoes using fluopyram and *Purpureocillium lilacinum* strain 251 [J]. *Crop Protection*, 2019, 124: 104874.

Dai XY, Ren SL, Zhou YT, *et al*. Advances in biological control of citrus psyllid *Diaphorina citri*, a vector insect of citrus huanglongbing disease [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2014, 30 (3): 414 – 419. [代晓彦, 任素丽, 周雅婷, 等. 黄龙病媒介昆虫柑橘木虱生物防治新进展 [J]. 中国生物防治学报, 2014, 30 (3): 414 – 419]

Du DC, Lu LM, Hu XR, *et al*. Isolation and identification of *Purpureocillium lilacinum* and its pathogenicity against *Diaphorina citri* [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2015, 27 (3): 393 – 399. [杜丹超, 鹿连明, 胡秀荣, 等. 淡紫紫孢菌菌株的分离、鉴定及其对柑橘木虱的致病性 [J]. 浙江农业学报, 2015, 27 (3): 393 – 399]

El-Akhdar EA, Ou Da SM. Pathogenicity of different fungal isolates to the adult stage of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedmann) [J]. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 2009, 1 (19): 5 – 10.

Fan GC, Liu B, Wu RJ, *et al*. Thirty years of research on citrus Huanglongbing in China [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2009, 24 (2): 183 – 190. [范国成, 刘波, 吴如健, 等. 中国柑橘黄龙病研究 30 年 [J]. 福建农业学报, 2009, 24 (2): 183 – 190]

Foo K, Seelan JSS, Dawood MM. Microfungi associated with *Pteroptyx bearni* (Coleoptera: Lampyridae) eggs and larvae from Kawang river, Sabah (Northern Borneo) [J]. *Insects*, 2017, 8 (3): 66.

Gallou A, Serna-Domínguez MG, Berlanga-Padilla AM, *et al*. Species clarification of *Isaria* isolates used as biocontrol agents against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) in Mexico [J]. *Fungal Biology*, 2016, 120 (3): 414 – 423.

Gao X. A discuss on current situation, problems and quality improvement of citrus industry in Guangxi [J]. *Southern Horticulture*, 2020, 31 (3): 36 – 39. [高兴. 广西柑橘产业现状、存在问题及提高质量探讨 [J]. 南方园艺, 2020, 31 (3): 36 – 39]

Gindin G, Levski S, Soroker V. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* [J]. *Phytoparasitica*, 2006, 34 (4): 370 – 379.

Hassan SM, Manzoor AA, Ghulam HJ, *et al*. Efficacy of different fungicides, botanical extracts and bio-control agents against

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

Cladosporium cladosporioides, the causal agent of Cladosporium rot in grapes [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2020, 44 (4): 300 – 305.

Lezama-Gutiérrez R, Molina-Ochoa J, Chávez-Flores O, *et al.* Use of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae*, *Cordyceps bassiana* and *Isaria fumosorosea* to control *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Persian lime under field conditions [J]. *International Journal of Tropical Insect Science*, 2012, 32 (1): 39 – 44.

Lin JX. Progress on control of citrus huanglongbing [J]. *Southeast Horticulture*, 2018, 6 (5): 45 – 52. [林积秀. 柑橘黄龙病的防治进展 [J]. 东南园艺, 2018, 6 (5): 45 – 52]

Lu LM, Cheng BP, Du DC, *et al.* Genetic diversity of *Lecanicillium lecanii* and its pathogenicity against *Diaphorina citri* [J]. *Journal of Zhejiang University* (Agriculture and Life Sciences), 2015, 41 (1): 34 – 43. [鹿连明, 程保平, 杜丹超, 等. 蜡蚧菌的遗传多样性及其对柑橘木虱的致病性 [J]. 浙江大学学报 (农业与生命科学版), 2015, 41 (1): 34 – 43]

Lu XP, Li XQ, Lu HM, *et al.* Suggestions on citrus variety structure adjustment in Guangxi [J]. *Southern Horticulture*, 2020, 31 (6): 82 – 84. [陆小平, 李秀琴, 陆红梅, 等. 广西柑橘品种结构调整建议 [J]. 南方园艺, 2020, 31 (6): 82 – 84]

Manjunath HM, Chandrashekhar GJ, Ananda D, *et al.* Biogenic synthesis of gold nanoparticles by marine endophytic fungus – *Cladosporium cladosporioides* isolated from seaweed and evaluation of their antioxidant and antimicrobial properties [J]. *Process Biochemistry*, 2017, 63: 137 – 144.

Qiao JC, Li XW, Shi R. Study on citrus industry in three major producing areas in China – taking Guangxi, Hunan and Hubei as examples [J]. *Yunnan Science and Technology Management*, 2021, 34 (1): 45 – 49. [乔进超, 李旭玮, 施蕊. 中国柑橘三大产区产业探究——以广西、湖南、湖北为例 [J]. 云南科技管理, 2021, 34 (1): 45 – 49]

Qin Y, Pan XY, Yuan ZL. Seed endophytic microbiota in a coastal plant and phytobeneficial properties of the fungus *Cladosporium cladosporioides* [J]. *Fungal Ecology*, 2016, 24: 53 – 60.

Song XB, Peng AT, Cheng BP, *et al.* Review of biological controls of *Diaphorina citri* using entomopathogenic fungi [J]. *Journal of Biosafety*, 2016, 25 (4): 255 – 260. [宋晓兵, 彭埃天, 程保平, 等. 利用虫生真菌生物防治柑橘木虱的研究进展 [J]. 生物安全学报, 2016, 25 (4): 255 – 260]

Song Z. A species of entomogenous fungus *Fusarium lateritium* isolated from citrus aphid [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2001, 6: 66 – 70. [宋漳. 从桔蚜上分离的一种致病镰刀菌 [J]. 林业科学, 2001, 6: 66 – 70]

Wang J, Hu JH, Long YL *et al.* Biological characteristics of a strain of *Cladosporium cladosporioides* that is highly pathogenic to *Panonychus citri* (McGregor) [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2016, 53 (1): 22 – 29. [王娟, 胡军华, 龙艳玲, 等. 柑桔全爪螨高致病力菌株芽枝状枝孢霉的生物学特性研究 [J]. 应用昆虫学报, 2016, 53 (1): 22 – 29]

Wang J, Zhang K, Zhang X, *et al.* Isolation, identification and diversity analysis of entomogenous fungi in Qinba Mountains [J]. *Journal of Northwest A & F University* (Natural Science Edition), 2021, 49 (6): 122 – 129. [王军, 张琨, 张绪, 等. 秦巴山区虫生真菌的分离鉴定与多样性分析 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2021, 49 (6): 122 – 129]

Yang Y, Wang M, Ma XY, *et al.* *Aspergillus* spp. isolated from *Bactrocera cucurbitae* in Hainan and their biological characteristic [J]. *Mycosystema*, 2016, 35 (1): 20 – 28. [杨叶, 王萌, 马晓燕, 等. 感染瓜实蝇的曲霉菌及其生物学特性 [J]. 菌物学报, 2016, 35 (1): 20 – 28]

Yehia RS, Osman GH, Assaggaf H, *et al.* Isolation of potential antimicrobial metabolites from endophytic fungus *Cladosporium cladosporioides* from endemic plant *Zygophyllum mandavillei* [J]. *South African Journal of Botany*, 2020, 134: 296 – 302.

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net