



马有花,来有鹏.茴香薄翅野螟病原真菌鉴定及其致病力评估[J].江西农业大学学报,2022,44(5):1112-1121.
MA Y H,LAI Y P.Identification and pathogenicity evaluation of pathogenic fungi from *Evergestis extimalis*[J].Acta agriculturae uni-
versitatis Jiangxiensis,2022,44(5):1112-1121.

茴香薄翅野螟病原真菌鉴定及其致病力评估

马有花,来有鹏*

(青海大学 三江源生态与高原农牧业国家重点实验室/青海省农业有害生物综合治理重点实验室,青海 西宁 810016)

摘要:【目的】明确茴香薄翅野螟(*Evergestis extimalis* Scopoli, 1763)幼虫患病个体上的病原菌种类,为该虫的生物防治提供理论依据。【方法】对感菌的茴香薄翅野螟幼虫经室内分离培养,以菌丝生长速度与产孢量为指标筛选出菌株生长的最适培养基,结合形态学及 rDNA-ITS 序列相似性分析鉴定病原真菌并采用浸渍法测定其对该虫的致病性。【结果】病原真菌为冻土毛霉(*Mucor hiemalis*, 1903),适宜生长的最优培养基是萨氏葡萄糖琼脂酵母膏(SDAY)培养基,该菌对茴香薄翅野螟幼虫均有一定致病力,处理 9 d 后 2、3、4 和 5 龄幼虫累计死亡率分别为 71.78%, 49.44%, 46.51% 和 28.89%,且侵染率随时间的推延而增大;该菌株在侵染茴香薄翅野螟 2 龄幼虫 8 d 后,LC₅₀ 为 1.02×10⁵ 孢子/mL,LT₅₀ 为 3.73 d。【结论】冻土毛霉(*M. hiemalis*)在茴香薄翅野螟的防治方面有生防潜力。

关键词:茴香薄翅野螟;病原真菌;冻土毛霉;致病力
中图分类号:S435.73;S476.12 **文献标志码:**A **文章编号:**1000-2286(2022)05-1112-10

Identification and Pathogenicity Evaluation of Pathogenic Fungi from *Evergestis extimalis*

MA Youhua, LAI Youpeng*

(Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture/Key Laboratory of Agricultural Integrated Pest Management of Qinghai Province, Qinghai University, Xining 810016, China)

Abstract: [Objective] This study aims to identify the species of pathogen on the carcasses of *Evergestis extimalis* Scopoli 1763 larvae, thus providing theoretical basis for biological control of *E. extimalis*. [Method] In this study, the infected larvae of *E. extimalis* were isolated and cultured in laboratory, and the optimum medium for the growth of the strain was selected according to the mycelial growth rate and spore yield. The pathogenic fungus was identified by morphological characterization and rDNA-ITS sequence analysis, and its pathogenicity to the larvae of *E. extimalis* was determined by impregnation method. [Result] The isolated fungus was identified as *Mucor hiemalis*, and the optimal medium for growth was SDAY medium. The strain could infect the 2nd-5th instar larvae of *E. extimalis*, the cumulative mortality was 71.78%, 49.44%, 46.51% and 28.89% respectively after 9 days of treatment, and the infection rate increased with time. After infecting the 2nd instar larvae of *E. extimalis* for 8 days, LC₅₀ was 1.02×10⁵ spores/mL, LT₅₀ was 3.73 d, respectively. [Conclusion] *M. hiemalis* has bio-control potential of *E. extimalis*.

收稿日期:2022-05-18 修回日期:2022-07-16
基金项目:青海省重大科技专项(2019NKA11)和青海省高端创新人才“千人计划”项目
Project supported by the Major Science and Technology Projects in Qinghai Province (2019NKA11) and the “Thousand Talents Plan” Project of High-end Innovative Talents in Qinghai Province
作者简介:马有花, orcid.org/0000-0002-2393-1620, m2218937@163.com; *通信作者:来有鹏, 副研究员, 博士, 主要从事昆虫生态与害虫防治研究, orcid.org/0000-0001-9188-9906, yplai@126.com。

Keywords: *Evergestis extimalis*; pathogenic fungi; *Mucor hiemalis*; pathogenicity

【研究意义】茴香薄翅野螟(*Evergestis extimalis* Scopoli, 1763)又称茴香螟、油菜螟、角野螟,在分类上属于鳞翅目(Lepidoptera),野螟蛾科(Crambidae),薄翅野螟亚科(Evergestinae),薄翅野螟属(*Evergestis*),寄主主要有油菜、茴香、白菜、甘蓝等^[1]。茴香薄翅野螟是青海高原春油菜田的毁灭性害虫,年均发生面积为油菜种植总面积的20%以上,造成严重的经济损失^[2]。茴香薄翅野螟对其寄主植物主要以幼虫卷叶,取食心叶、种芽的方式为害,在油菜上主要以幼虫啃食嫩茎、钻蛀油菜角果取食籽粒的方式为害^[2-3]。目前生产上以化学防治为主,并且防治时使用的农药品种单一^[3],由于该虫已对常用农药产生较强的抗性,再加上农药残留对于人畜的安全隐患,化学农药防治已受到了一定限制^[4-5],因此探索一种高效、低毒、低残留的微生物杀虫剂迫在眉睫。【前人研究进展】昆虫病原真菌作为一类广泛存在于自然界的重要资源,能感染昆虫并在其体表或体内增殖,使昆虫发病甚至死亡^[6],进而高度有效地调控昆虫种群数量动态。现阶段,在利用昆虫病原真菌防治农林害虫方面,半知菌亚门的白僵菌和绿僵菌因具有寄主范围广、致病力强等优点而受到各界的广泛关注^[7]。王海鸿等^[8]研发了防治西花蓟马(*Frankliniella occidentalis* Pergande)的150亿孢子/g球孢白僵菌可湿性粉剂,在该害虫的生物防治中取得了很好的效果并已商业化;Shehzad等^[9]研究表明在接种物直接喷施法及浸叶法2种不同的施用方法下,球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)和金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)对小菜蛾(*Plutella xylostella*)2龄和3龄幼虫都有较强的毒力。毛霉属真菌广泛分布在自然界中,寄生于动植物或腐生于土壤、动植物残体等基物^[10-11],部分毛霉菌是一些鳞翅目、鞘翅目和双翅目昆虫的病原体^[12]。Heitor^[13]从甘蓝夜蛾(*Mamestra brassicae*)幼虫个体上分离出一株有致毒作用的冻土毛霉(*Mucor hiemalis*);Reiss等^[14]发现冻土毛霉(*M. hiemalis*)对卤虫(*Artemia salina*)具有致病性;Konstantopoulou和Mazomenos^[15]从患病的橄榄果实蝇(*Bactrocera oleae*)蛹和蛀茎夜蛾(*Sesamia nonagrioides*)幼虫中分离到6种昆虫病原真菌,试验表明2株冻土毛霉(*M. hiemalis*)对地中海实蝇(*Ceratitis capitata*)幼虫有较好的防治效果。Konstantopoulou等^[16]研究发现冻土毛霉(*M. hiemalis* SMU-21)的代谢提取物具有杀虫活性。【本研究切入点】目前关于茴香薄翅野螟的病原真菌未见文献报道。【拟解决的关键问题】本研究从青海省大通回族土族自治县采集的茴香薄翅野螟幼虫尸体上分离纯化得到了一株致病真菌,通过形态学及ITS分子鉴定确定其分类地位,研究菌株对茴香薄翅野螟的致病性,以为生防剂的研发、绿色防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源及培养基

在青海省西宁市大通县、湟中县采集茴香薄翅野螟卵及幼虫,置于20℃,相对湿度80%的条件下饲养。

1.2 病原真菌的分离纯化

参考Hallouti等^[17]的方法,将感病的茴香薄翅野螟幼虫,浸入含有0.3%次氯酸钠的蒸馏水溶液中消毒1min,接着用无菌蒸馏水冲洗4次后放入底部铺有无菌滤纸的一次性培养皿中保湿培养。待虫体长出菌丝或孢子时,在超净工作台中挑取少量菌丝或孢子接种于PDA培养基,放置25℃培养箱培养3d。将长好的菌丝挑入新的PDA平板,如此往复纯化4次后的菌株于4℃冰箱保存。

1.3 病原真菌的适宜培养基筛选

从8种供试培养基(表1)中筛选出适宜病原真菌生长的培养基,以供后续试验使用。将活化的菌株打菌饼($d=8\text{ mm}$)接种于各培养基平板中心,于25℃恒温箱培养3d,每天观察菌落形态并用十字交叉法测量菌落直径,计算日平均长速;3次重复,培养6d后在无菌条件下用无菌水洗脱孢子,4层纱布过滤,制成孢子悬浮液,于光学显微镜下用血球计数板计数产孢量。

1.4 病原真菌的形态学观察

取活化的菌株打菌饼($d=8\text{ mm}$)接种于PDA平板,将灭菌盖玻片斜插入培养基中,于25℃恒温箱培养2~3d,经乳酸酚棉蓝染色液染色后,用光学显微镜观察菌株形态,参照真菌鉴定手册^[18],对病原菌进行形态学鉴定。

表 1 供试培养基及其配方
Tab.1 Test medium and its formula

编号 Number	培养基名称 Medium name	培养基成分 Medium component
A	淀粉琼脂培养基 SA medium	可溶性淀粉 40 g/L, 酵母膏 5 g/L, 琼脂 20 g/L, pH 自然
B	察氏培养基 Czapek-Dox medium	蔗糖 30.00 g/L, K ₂ HPO ₄ 1.00 g/L, MgSO ₄ 0.50 g/L, KCl 0.50 g/L, NaNO ₃ 3.00 g/L, FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.01 g/L, 琼脂 20.00 g/L, pH 自然
C	葡萄糖蛋白胨琼脂培养基 CPA medium	蛋白胨 10 g/L, 葡萄糖 40 g/L, 琼脂 20 g/L, pH 自然
D	PDA 培养基 PDA medium	去皮马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 琼脂 18 g/L, pH 自然
E	孟加拉红培养基 Rose Bengal medium	蛋白胨 5.0 g/L, 葡萄糖 10.0 g/L, KH ₂ PO ₄ 1.0 g/L, MgSO ₄ 0.5 g/L, 1/3 000 孟加拉红 100 mL/L, 琼脂 18.0 g/L, pH 自然
F	萨氏葡萄糖琼脂酵母膏 SDAY medium	葡萄糖 40 g/L, 酵母膏 10 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 琼脂 20 g/L, pH 自然
G	蛋白胨马铃薯葡萄糖琼脂 PPDA medium	去皮马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 琼脂 18 g/L, pH 自然
H	酵母膏琼脂培养基 YEA medium	葡萄糖 4 g/L, 酵母膏 4 g/L, 麦芽糖 10 g/L, 琼脂 20 g/L, pH 自然

1.5 病原真菌的分子生物学鉴定

用 CTAB 法^[19]提取菌株基因组 DNA, 运用真菌通用引物 ITS1(5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′)、ITS4(5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′)进行 ITS-PCR 扩增, 引物均由上海生工生物有限责任公司合成。PCR 扩增反应体系: ITS1/ITS4 引物各 1 μL、模板 DNA 1 μL、PCR MasterMix 12.5 μL、ddH₂O 9.5 μL, 反应条件: 95 ℃预变性 5 min; 94 ℃变性 30 s, 57 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 90 s, 30 个循环 72 ℃延伸 10 min。将扩增产物送往上海生工生物有限责任公司进行测序。

将菌株的序列测定结果提交至 GenBank 核酸序列数据库中, 进行 BLAST 比对^[20], 从中选取同源性较高的序列, 利用 MEGA 7.0^[21]软件, 按照邻接法, 运行 1 000 次 bootstrap 计算, 构建系统发育树(Neighbor joining tree)对菌株进行分类鉴定。

1.6 病原真菌的致病性测定

依据柯赫氏法则验证菌株对茴香薄翅野螟幼虫的致病性。供试菌株接种于 SDAY 平板, 25 ℃活化培养 6 d, 在超净工作台用 10 mL 无菌水溶液(含 0.5 mL 0.05% 吐温 80)洗脱孢子, 4 层纱布过滤菌丝, 制成孢子悬浮液, 用血球计数板调节孢子液浓度为 1×10⁷ 孢子/mL, 10 mL 无菌水溶液(含 0.5 mL 0.05% 吐温 80)为空白对照。采用浸渍法进行生物测定。用毛笔挑选 2~5 龄幼虫, 放入孢子悬浮液中, 浸渍 20 s 挑出, 晾干后, 移入自制的养虫盒(8 cm×14 cm×5 cm)中, 以新鲜的白菜饲养。各处理 15 头幼虫, 重复 4 次, 每天观察幼虫存活情况, 将死亡幼虫于铺有湿润滤纸的培养皿(d=9 cm)中进行观察^[22], 虫体长出白色菌丝者即为感染。

1.7 不同孢子浓度对茴香薄翅野螟 2 龄幼虫的毒力

将培养 8 d 的菌株按 1.6 所述方式制孢子液后, 稀释成 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸ 孢子/mL 悬浮液, 选取同等大小的 2 龄幼虫浸入不同浓度孢子悬浮液中 20 s, 自然风干后, 于养虫盒中饲喂白菜并定期更换菜叶。各处理 15 头幼虫, 重复 3 次, 按时观察记录幼虫死亡情况, 将死亡幼虫保湿培养^[22]。

1.8 数据处理

$$\text{累计死亡率} = \frac{\text{死亡总虫数}}{\text{处理总虫数}} \times 100\% \tag{1}$$

$$\text{累计校正死亡率} = \frac{\text{处理累计死亡率} - \text{对照累计死亡率}}{1 - \text{对照累计死亡率}} \times 100\% \tag{2}$$

利用 Excel 整理数据, SPSS 26.0 软件进行处理分析, 统计处理幼虫的累计死亡率和累计校正死亡率, 求得回归方程、致死中时及致死中浓度, 用 Graphpad prism 8.0 作图。

2 结果与分析

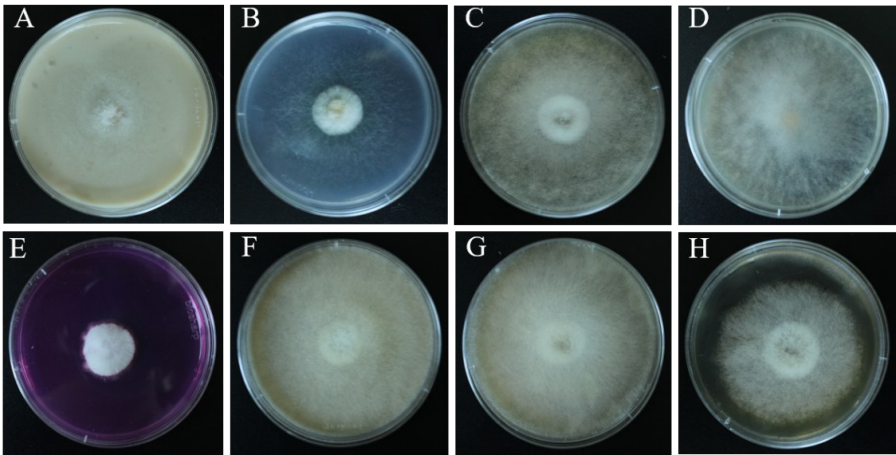
2.1 病原真菌的适宜培养基筛选

据图 1 及表 2 可知, 病原菌在试验所选的 8 种培养基上都能生长。菌株在孟加拉红培养基、SDAY 培

培养基、PPDA 培养基中菌丝发达致密,边缘整齐;在 CPA 培养基、PDA 培养基、YEA 培养基中菌丝前期致密,后期稀疏;相对其他培养基而言,菌株在 SA 培养基和察氏培养基中长势较差、稀疏。

表 2 菌株在不同培养基上的菌落形态
Tab.2 Colony morphology of strain on different media

培养基 Medium	菌落形态 Colony morphology
淀粉琼脂培养基 SA medium	菌落白色,菌丝稀疏,呈棉絮状,边缘整齐
察氏培养基 Czapek-Dox medium	菌落白色,菌丝初始致密,逐渐稀疏,呈棉絮状,边缘不整齐
葡萄糖蛋白胨琼脂培养基 CPA medium	菌落中间白色,菌丝呈羽毛状,边缘灰白色,呈绒毛状,边缘整齐
PDA 培养基 PDA medium	菌落白色,菌丝中间致密,边缘稀疏,呈羽毛状,边缘整齐
孟加拉红培养基 Rose Bengal medium	菌落白色,菌丝致密,呈绒毛状,边缘整齐
萨氏葡萄糖琼脂酵母膏 SDAY medium	菌落白色,菌丝致密,呈棉絮状,边缘整齐
蛋白胨马铃薯葡萄糖琼脂 PPDA medium	菌落白色,菌丝致密,呈羽毛状,边缘整齐
酵母膏琼脂培养基 YEA medium	菌落白色,菌丝中间致密,边缘稀疏,呈棉絮状,边缘整齐



A: 淀粉琼脂培养基;B: 察氏培养基;C: 葡萄糖蛋白胨琼脂培养基;D: PDA 培养基;E: 孟加拉红培养基;F: 萨氏葡萄糖琼脂酵母膏;G: 蛋白胨马铃薯葡萄糖琼脂;H: 酵母膏琼脂培养基。

A: SA medium; B: Czapek-Dox medium; C: CPA medium; D: PDA medium; E: Rose Bengal medium; F: SDAY medium; G: PPDA medium; H: YEA medium.

图 1 菌株在不同培养基上的菌落形态
Fig.1 Colony morphology of strain on different media

由图 2 所示,菌株在不同培养基上的日平均长速和产孢量存在差异。菌株在 PPDA 培养基上生长速度最快,达 2.81 cm/d,SDAY 培养基和 CPA 培养基次之,长速分别为 2.80 cm/d、2.71 cm/d,彼此无显著差异,孟加拉红培养基中菌丝生长最慢,仅为 0.50 cm/d;培养 6 d 后病原真菌在 SDAY 培养基上产孢量最高,为 2.9×10^7 孢子/mL,孟加拉红培养基及 PPDA 培养基次之,分别是 2.8×10^7 孢子/mL、 2.25×10^7 孢子/mL,察氏培养基产孢量最低,为 0.06×10^7 孢子/mL,显著小于其他培养基。因此,综合菌落形态、生长速度及产孢量,选择 SDAY 培养基为最适培养基。

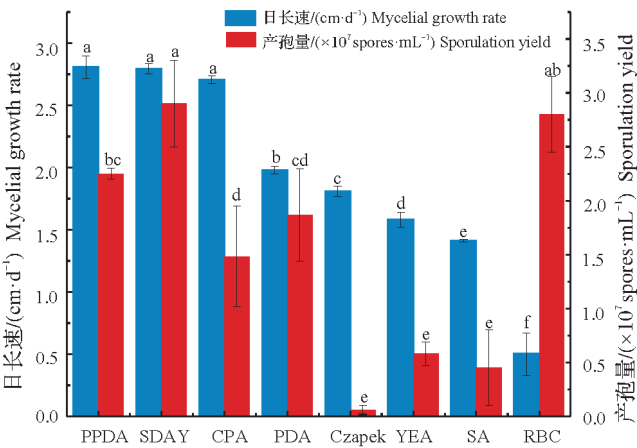
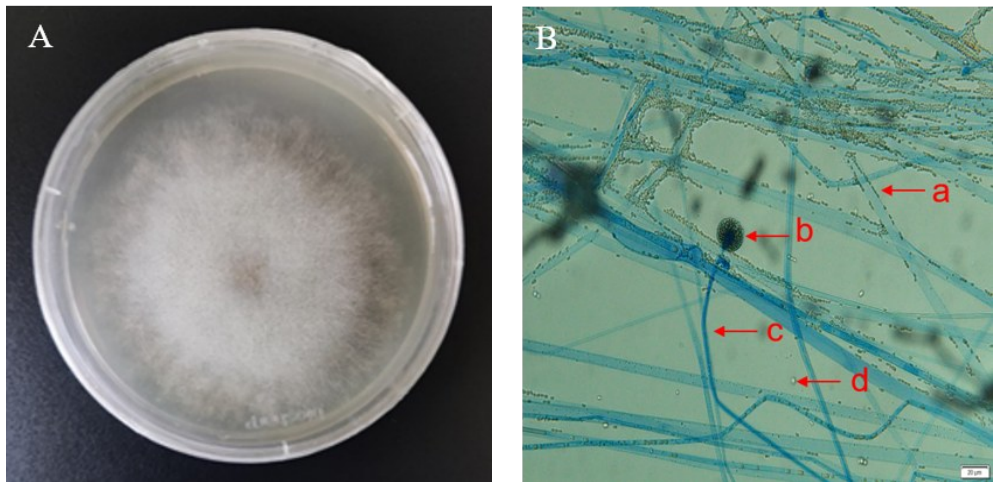


图 2 菌株在不同培养基上的日长速及产孢量
Fig.2 Comparison of growth rate and sporulation yield of strain on different media

2.2 病原真菌的形态学特征

菌株在 PDA 培养基培养 2~3 d,菌丝生长迅速,呈白色羽毛状,中间致密,边缘稀疏,菌落圆形(图 1A);在光学显微镜下观察到菌株菌丝无隔,孢囊梗直立单生,顶生球状孢子囊,含大量孢囊孢子,孢子椭圆形、圆形(图 1B)。根据以上观察结果,参考魏景超^[18]的研究,初步鉴定该菌为毛霉属真菌。



A: 菌落形态;B:PDA 培养基上菌株形态学;a: 菌丝;b: 孢子囊;c: 孢囊梗;d: 孢囊孢子。
A: colony morphology; B: morphology of strains on PDA media; a: mycelium; b: sporangia; c: sporangiophore; d: sporangium.

图 3 病原真菌生物学特征

Fig.3 Biological characteristics of pathogenic fungi

2.3 病原真菌的分子生物学鉴定

通过测序得到 535 bp DNA 序列,提交至 NCBI 数据库(登录号:OK427267)进行 BLAST 比对,结果表明分离株与冻土毛霉(*Mucor hiemalis*)对应序列的同源性高达 100%,构建系统发育树(图 4),发现菌株与 *M. hiemalis* 聚为一类,支持率为 100%,结合形态学和 ITS 序列相似性分析,最终确定该菌为冻土毛霉,菌株编号 QH01。

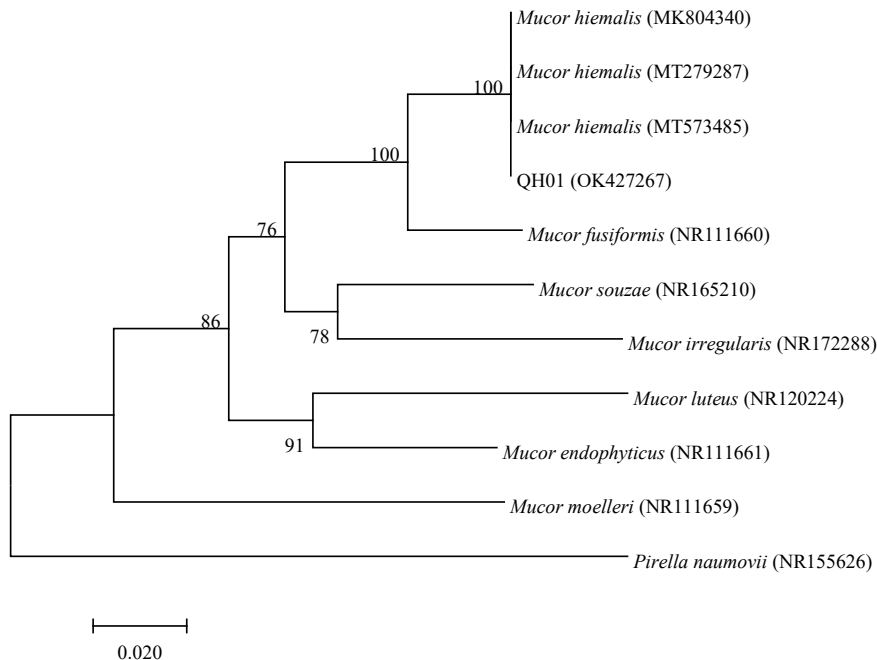
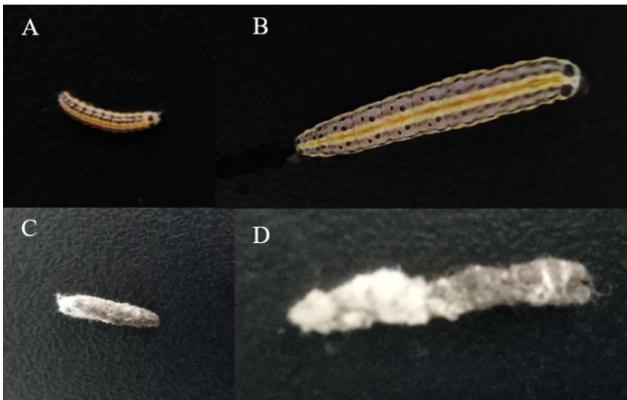


图 4 基于 ITS 序列构建的菌株 QH01 系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of strain QH01 based on ITS sequence

2.4 病原真菌的致病性分析

根据柯赫氏法则验证菌株对茴香薄翅野螟幼虫的致病性,结果表明:菌株 QH01 对 2~5 龄幼虫均有一定致病力。以 2、4 龄幼虫为例,幼虫死亡时变为褐色或黑红色,虫体软化,保湿培养 2~3 d,体表覆盖白色菌丝和黑色孢子囊(图 5)。表 3 所示,接菌处理后茴香薄翅野螟 2~5 龄幼虫累计死亡率随龄期的增长而下降,侵染第 3~5 天各龄幼虫累计死亡率存在极显著差异,但在第 7~9 天 3 龄幼虫与 4 龄幼虫的累计死亡率无显著差异;低龄幼虫比高龄幼虫对菌株更敏感,以 1×10^7 孢子/mL 孢子液处理 9 d 后 2 龄幼虫的累计死亡率为 71.78%,而 5 龄幼虫的仅为 28.89%。



A,B:健康幼虫;C,D:感病幼虫;A,C:2龄;B,D:4龄。
A,B: healthy larvae; C,D: infected larvae; A,C: 2nd instar; B,D: 4th instar.
图 5 茴香薄翅野螟幼虫侵染症状

Fig.5 Infection symptoms of *Evergestis extimalis* larvae

表 3 冻土毛霉处理后不同时间茴香薄翅野螟幼虫累计死亡率

Tab.3 Cumulative mortality of *Evergestis extimalis* larvae at different times after treatment with *Mucor hiemalis*

龄期 Instar	累计死亡率/% Cumulative mortality			
	3 d	5 d	7 d	9 d
2 龄 2 nd instar	32.37±0.86 ^{Aa}	59.32±1.87 ^{Aa}	62.66±0.92 ^{Aa}	71.78±0.62 ^{Aa}
3 龄 3 rd instar	25.56±2.00 ^{Bb}	35.55±1.47 ^{Bb}	41.11±0.56 ^{Bb}	49.44±0.56 ^{Bb}
4 龄 4 th instar	10.46±0.42 ^{Cc}	18.68±2.10 ^{Cc}	37.17±2.35 ^{Bb}	46.51±0.88 ^{Bb}
5 龄 5 th instar	5.57±0.57 ^{Cd}	11.75±1.03 ^{Cd}	21.67±0.96 ^{Cc}	28.89±1.47 ^{Cc}

表中数据为平均值±标准误;同列数据肩标相同大写字母为 0.01 水平下无显著差异,相同小写字母则为 0.05 水平下无显著差异。
Data are mean±SE. Same capital letters indicate no significant difference at 0.01 level, while same lowercase letters indicate no significant difference at 0.05 level.

由图 6 可知,孢子悬浮液接种茴香薄翅野螟 2~5 龄幼虫后,随着时间的推移,累计死亡率都呈现逐渐

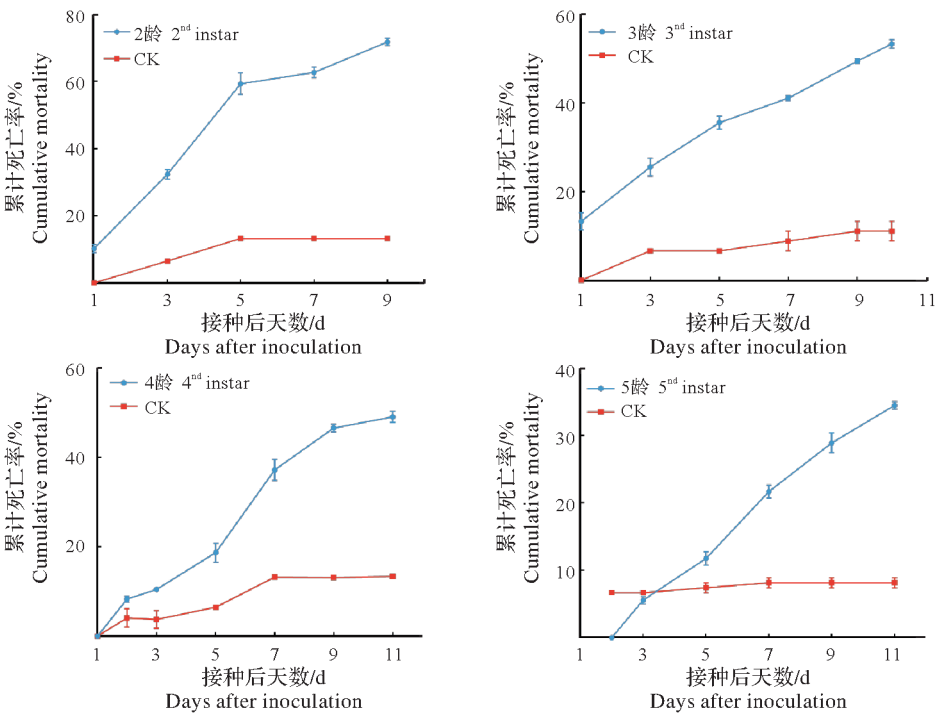


图 6 冻土毛霉 1×10^7 个/mL 的孢子浓度对茴香薄翅野螟幼虫的致病力
Fig.6 The virulence of *Mucor hiemalis* at 1×10^7 spores/mL concentration on *Evergestis extimalis* larvae

上升的趋势。2 龄幼虫接菌 1 d 后出现死亡,3~5 d 死亡率增长较快,随后渐趋平稳,接菌 9 d 后全部死亡,累计校正死亡率达 66.7%;侵染 3 龄幼虫 1 d 后出现感菌死亡,1~5 d 增长较快,10 d 后全部死亡,累计校正死亡率为 47.50%;接种 4 龄幼虫 2 d 后初见感染,11 d 后供试幼虫全部死亡,累计校正死亡率为 41.28%;5 龄幼虫处理 3 d 后感菌且在 1~3 d 对照累计死亡率高于处理组,11 d 后幼虫全部死亡,累计校正死亡率仅 28.50%。

2.5 不同孢子浓度对茴香薄翅野螟 2 龄幼虫的毒力

随着经冻土毛霉侵染时间的延长,冻土毛霉对茴香薄翅野螟 2 龄幼虫的 LC_{50} 减小,在处理第 5 天,对茴香薄翅野螟 2 龄幼虫的 LC_{50} 最大,为 1.38×10^6 孢子/mL,当侵染第 8 天后,对茴香薄翅野螟 2 龄幼虫的 LC_{50} 最小,为 1.02×10^5 孢子/mL(表 4);冻土毛霉对茴香薄翅野螟 2 龄幼虫的 LT_{50} 随着接种浓度的增加而缩短,当冻土毛霉孢子浓度为 10^8 孢子/mL 时,对茴香薄翅野螟 2 龄幼虫的 LT_{50} 最短,为 3.73 d,而当冻土毛霉孢子浓度为 10^5 孢子/mL 时,茴香薄翅野螟 2 龄幼虫的 LT_{50} 最大,为 6.74 d,见表 5。

表 4 冻土毛霉对茴香薄翅野螟 2 龄幼虫的 LC_{50}

Tab.4 LC_{50} of *Mucor hiemalis* against *Evergestis extimalis* second instar larvae

时间/d Time	回归方程 Toxicity regression equation	$LC_{50}/(\text{spores} \cdot \text{mL}^{-1})$	95% 置信区间/ $(\text{spores} \cdot \text{mL}^{-1})$ 95% confidence interval
5	$y = -2.081 + 0.339x$	1.38×10^6	$2.27 \times 10^5 \sim 5.15 \times 10^6$
6	$y = -2.107 + 0.362x$	6.61×10^5	$8.64 \times 10^4 \sim 2.22 \times 10^6$
7	$y = -2.220 + 0.397x$	3.88×10^5	$4.91 \times 10^4 \sim 1.23 \times 10^6$
8	$y = -1.599 + 0.319x$	1.02×10^5	$1.14 \times 10^3 \sim 5.18 \times 10^5$

表 5 冻土毛霉对茴香薄翅野螟 2 龄幼虫的 LT_{50}

Tab.5 LT_{50} of *Mucor hiemalis* against *Evergestis extimalis* second instar larvae

浓度/ $(\text{spores} \cdot \text{mL}^{-1})$ Concentration	回归方程 Toxicity regression equation	LT_{50}/d	95% 置信区间/d 95% confidence interval
10^5	$y = -2.658 + 3.208x$	6.74	5.77~9.05
10^6	$y = -2.227 + 2.761x$	6.40	4.61~8.80
10^7	$y = -3.009 + 4.118x$	5.38	3.97~6.01
10^8	$y = -2.484 + 4.346x$	3.73	1.26~4.66

3 讨论与结论

昆虫病原真菌资源丰富,生长繁殖快易生产,能寄生多种昆虫,且害虫很难产生抗性,因此在农林害虫防治上具有相当大的优势^[23]。生防菌株资源的发现及鉴定是利用昆虫病原真菌进行害虫生物防治的基础^[24-25]。相较其他昆虫,茴香薄翅野螟的生物防治资源较为匮乏。本研究从罹病的茴香薄翅野螟幼虫体上分离得到了一株病原真菌,结合形态学及分子生物学鉴定为冻土毛霉(*M. hiemalis*),通过柯赫氏法则验证其致病性,结果表明菌株对茴香薄翅野螟低龄幼虫有较强致病力,对高龄幼虫也有一定防治效果。研究病原真菌的培养条件对提高其利用率具有重要意义。赵鹏飞等^[26]从 6 种培养基中筛选出寄生曲霉 Q527(*Aspergillus nomius* Q527)生长最优培养基为 PDA 培养基;刘思雨等^[27]研究发现,SDAY 培养基是金龟子绿僵菌 MAXD170705 生长及产孢的最适培养基,本试验表明在此培养基上冻土毛霉的表现相比其他培养基更好。近年来,许多研究表明昆虫病原真菌对多种鳞翅目害虫有较强的防治效果^[28-31]。郑亚强等^[32]经分离培养获得莱氏绿僵菌(*Metarhizium rileyi* ZYSP190701),用 1×10^8 孢子/mL 浓度接种草地贪夜蛾 3 龄幼虫 7 d 后,幼虫的感染率达 100%;何劲等^[33]分离获得 4 株虫生真菌并测定菌株对小菜蛾的毒力,试验表明 4 株菌对小菜蛾都有一定毒力且致死率随时间的延长而提高,本研究结果与之相似;有研究者^[34]在测定莱氏野村菌(*Nomuraea rileyi*)对斜纹夜蛾(*Spodoptera litura*)幼虫的致病力时发现菌株对 2 龄幼虫的侵染率最高,本试验结果与其一致。

冻土毛霉 QH01 在室内虽对茴香薄翅野螟 2~5 幼虫均有致病力,但对高龄幼虫的侵染效果不佳,因此选用 2 龄幼虫测定菌株对其的毒力。据报道,金龟子绿僵菌 CHMA-005 对茶尺蠖(*Ectropis oblique*)幼虫的 LC_{50} 随侵染时间的减少,呈现梯度上升趋势^[35];雷妍圆等^[36]试验表明莱氏绿僵菌 GZSF-1

对草地贪夜蛾2龄幼虫第7天的 LC_{50} 是 1.02×10^6 孢子/mL,随孢子悬浮液浓度的升高,幼虫的 LT_{50} 缩短,当浓度为 1×10^9 孢子/mL时,幼虫的 LT_{50} 为3.03 d。本研究也发现随着经冻土毛霉侵染时间的延长,冻土毛霉对茴香薄翅野螟2龄幼虫的 LC_{50} 递减,在侵染第8天后,对茴香薄翅野螟2龄幼虫的 LC_{50} 最小,为 1.02×10^5 孢子/mL,接种浓度为 10^8 孢子/mL时,对茴香薄翅野螟2龄幼虫的 LT_{50} 为3.73 d。综上,冻土毛霉QH01有很好的生防潜能,值得发掘利用。

毛霉菌多为腐生,广泛应用于发酵工程^[37],少数可致人和动物发病^[38]。但毛霉菌对害虫有防治效果的相关报道很少。陈健鑫等^[39]在云南香格里拉叉襁科稚虫虫体上得到一株冻土毛霉,该菌在稚虫处于亚健康状态及抵抗力降低时易感,会加速寄生过程使稚虫死亡;本试验表明冻土毛霉QH01对健康的茴香薄翅野螟低龄幼虫有较高的致死率,用 1×10^7 孢子/mL孢子液处理9 d后2龄幼虫的累计死亡率达71.78%,但对高龄幼虫的致死率较低,这种显著差异可能归因于不同的体壁结构和免疫能力,鳞翅目害虫的低龄幼虫体壁比高龄幼虫体壁较薄,致病菌更易侵染,高龄幼虫的角质层硬化增厚、免疫及代谢加强因而抗病性更强^[40-41];以 10^8 孢子/mL冻土毛霉孢子液接种2龄幼虫的 LT_{50} 最短,为3.73 d,因此利用该菌株防治茴香薄翅野螟幼虫的适宜期是低龄幼虫高峰期。王燕^[42]从患病韭菜迟眼蕈蚊(*Bradysia odoriphaga*)幼虫中分离到一株冻土毛霉菌,经试验发现该菌对韭菜迟眼蕈蚊不同虫态的致病力存在显著差异,对韭菜迟眼蕈蚊幼虫有较强致病力,而对卵及蛹的致病力相对较弱;本试验仅测定了菌株QH01对茴香薄翅野螟幼虫的致病力,对其他虫态的致病性需进一步研究。许多昆虫病原真菌在室内条件下具有良好的致病性,但其田间效果取决于有利的环境条件,如温度、湿度和微生物特性等^[43-44]。研究^[45]表明18~28℃是冻土毛霉BO-1生长和产孢的最适温度,经生物测定发现在此温度下该菌对韭菜迟眼蕈蚊幼虫的致病性高于其他温度。但冻土毛霉QH01的生物学特性、侵染机制等尚不清楚,仍需进一步探究。

本研究首次报道了冻土毛霉对茴香薄翅野螟幼虫的致病性,丰富了该虫的生防资源,为后续菌株对茴香薄翅野螟致病机理的深入研究奠定基础,也为该虫生防制剂的研发、绿色防控和农产品质量安全问题提供了理论依据。

参考文献 References:

- [1] LAI Y P, TAO K, HOU T P. Preliminary analysis of geographical distribution based on cold hardiness for *Evergestis extimalis* (Scopoli) (Lepidoptera: Pyralidae) on Qinghai-Tibet Plateau [J]. Entomological research, 2019, 49(1): 13-20.
- [2] 张登峰, 咸文荣, 来有鹏, 等. 茴香薄翅野螟发生动态的调查 [J]. 昆虫知识, 2010, 47(1): 201-203.
ZHANG D F, XIAN W R, LAI Y P, et al. Investigation of the occurrence dynamics of *Evergestis extimalis* [J]. Chinese bulletin of entomology, 2010, 47(1): 201-203.
- [3] 王一鸣. 茴香薄翅野螟抗毒死蜱和高效氯氰菊酯的初步研究 [D]. 西宁: 青海大学, 2017.
WANG Y M. Studies on pesticide-resistance of *Evergestis extimalis* Scopoli populations to chlorpyrifos and beta-cypermethrin [D]. Xining: Qinghai University, 2017.
- [4] 张锡贞, 张红雨. 生物农药的应用与研究现状 [J]. 山东理工大学学报(自然科学版), 2004, 18(1): 96-100.
ZHANG X Z, ZHANG H Y. Current status in research and application of biopesticides [J]. Journal of Shandong university of technology (natural science edition), 2004, 18(1): 96-100.
- [5] BIANCO C A, PORTILLA M, JURAT-FUENTES J, et al. Susceptibility of isofamilies of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1Ac and Cry1Fa proteins of *Bacillus thuringiensis* [J]. Southwestern entomologist, 2010, 35(3): 409-415.
- [6] SHAH P A, PELL J K. Entomopathogenic fungi as biological control agents [J]. Applied microbiology and biotechnology, 2003, 61(5/6): 413-23.
- [7] LOVETT B, ST LEGER R J. Genetically engineering better fungal biopesticides [J]. Pest management science, 2018, 74(4): 781-789.
- [8] 王海鸿, 刘胜, 王帅宇, 等. 150亿孢子/g球孢白僵菌可湿性粉剂的研发及对西花蓟马的防治应用 [J]. 中国生物防治学报, 2020, 36(6): 858-861.
WANG H H, LIU S, WANG S Y, et al. Research and development of wettable powder of *Beauveria bassiana* and its control and application to *Frankliniella occidentalis* [J]. Chinese journal of biological control, 2020, 36(6): 858-861.
- [9] SHEHZAD M, TARIQ M, MUKHTAR T, et al. On the virulence of the entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales), against the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera:

- Plutellidae)[J].Egyptian journal of biological pest control, 2021, 31(1): 86-92.
- [10] 吕美林, 刘泽, 宋震, 等. 大兴安岭地区可培养毛霉门真菌多样性与分布[J].生物多样性, 2019, 27(8): 821-832.
LYU M L, LIU Z, SONG Z, et al. Diversity and distribution of culturable Mucoromycota fungi in the Greater Khinggan Mountains, China[J]. Biodiversity science, 2019, 27(8): 821-832.
- [11] ZYCHA H, SIEPMANN R, LINNEMANN G. Mucorales[M]. Vaduz: Cramer, 1969: 87.
- [12] NENTWIG W, PRILLINGER H. A zygomycetous fungus as a mortality factor in a laboratory stock of spiders[J]. Journal of arachnology, 1990, 18(1): 118-121.
- [13] HEITOR F. Parasitisme de blessure par le champignon *Mucor hiemalis* Wehmer chez les insecte[J]. Annales des epiphyties, 1962, 13(3): 179-203.
- [14] REISS J. Biotoxic activity in the mucorales[J]. Mycopathologia, 1993, 121(2): 123-127.
- [15] KONSTANTOPOULOU M A, MAZOMENOS B E. Evaluation of *Beauveria bassiana* and *B. brongniartii* strains and four wild-type fungal species against adults of *Bactrocera oleae* and *Ceratitis capitata*[J]. Biocontrol, 2005, 50(2): 293-305.
- [16] KONSTANTOPOULOU M A, MILONAS P, MAZOMENOS B E. Partial purification and insecticidal activity of toxic metabolites secreted by a *Mucor hiemalis* strain (SMU-21) against adults of *Bactrocera oleae* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)[J]. Journal of economic entomology, 2006, 99(5): 1657-1664.
- [17] HALLOUTI A, MOHAMED A H, ABDELAZIZ Z, et al. Diversity of entomopathogenic fungi associated with Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)) in Moroccan Argan forests and nearby area: impact of soil factors on their distribution[J]. BMC ecology, 2020, 20(1): 64-64.
- [18] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 70-74.
WEI J C. Fungi identification manual[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1979: 70-74.
- [19] ARSENEUA J R, STEEVES R, LAFLAMME M. Modified low-salt CTAB extraction of high-quality DNA from contaminant-rich tissues[J]. Molecular ecology resources, 2017, 17(4): 686-693.
- [20] 张挺峰, 王睿, 刘长仲. 一株侵染豌豆蚜的昆虫病原真菌的分离及鉴定[J]. 昆虫学报, 2020, 63(1): 22-28.
ZHANG T F, WANG R, LIU C Z. Isolation and identification of an entomopathogenic fungus infecting *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae)[J]. Acta entomologica Sinica, 2020, 63(1): 22-28.
- [21] KUMAR S, NEI M, DUDLEY J, et al. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences[J]. Briefings in bioinformatics, 2008, 9(4): 299-306.
- [22] 李美君, 白庆荣, 臧连生, 等. 水稻二化螟病原真菌鉴定及其致病力[J]. 中国生物防治学报, 2019, 35(1): 63-69.
LI M J, BAI Q R, ZANG L S, et al. Pathogenic fungi identified from the striped stem borer, *Chilo suppressalis* and their pathogenicity[J]. Chinese journal of biological control, 2019, 35(1): 63-69.
- [23] 代园凤, 张承, 喻会平, 等. 一株寄生曲霉 SF-2 对甘蔗绵蚜的感染作用及其生物学特性初步研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2017, 32(6): 1006-1011.
DAI Y F, ZHANG C, YU H P, et al. The infection of a SF-2 strain of *Aspergillus* sp. on sugarcane aphid and preliminary study on its biological characteristics[J]. Journal of Yunnan agricultural university (natural science), 2017, 32(6): 1006-1011.
- [24] 刘振邦. 苏云金芽孢杆菌晶体杀虫蛋白 Cry1Ac 基因在虫生真菌球孢白僵菌中的表达[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2011.
LIU Z B. Expression of Cry1Ac gene in entomogenous fungus *Beauveria bassiana*[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2011.
- [25] 黄鹏, 姚锦爱, 余德亿, 等. 虫生真菌 BB-T02 分离鉴定及其对两种蓟马的致病力[J]. 中国生物防治学报, 2020, 36(6): 929-937.
HUANG P, YAO J A, YU D Y, et al. Identification and pathogenicity of entomopathogenic fungi BB-T02 against two thrip species[J]. Chinese journal of biological control, 2020, 36(6): 929-937.
- [26] 赵鹏飞, 常明山, 罗辑, 等. 一株寄生曲霉 Q527 对黄野螟的感染作用及生物学特性[J]. 广东农业科学, 2019, 46(2): 106-112+173.
ZHAO P F, CHANG M S, LUO J, et al. Infection effect of a strain of *Aspergillus* sp. Q527 on *Heortiavites soides* and its biological characteristics[J]. Guangdong agricultural sciences, 2019, 46(2): 106-112+173.
- [27] 刘思雨, 薛锐, 肖关丽, 等. 一株小阔胫绒金龟幼虫绿僵菌的分离鉴定及培养条件的优化研究[J]. 应用昆虫学报, 2019, 56(6): 1410-1421.
LIU S Y, XUE R, XIAO G L, et al. Use of an orthogonal rotation combination design to identify optimal culture conditions for a *Metarhizium* sp. isolated from *Maladera ovatula* (Fairmaire) larvae[J]. Chinese journal of applied entomology, 2019, 56(6): 1410-1421.
- [28] MICHEREFF-FILHO M, TORRES J B, ANDRADE L N, et al. Effect of some biorational insecticides on *Spodoptera eridania* in organic cabbage[J]. Pest management science, 2008, 64(7): 761-767.

- [29] 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.
LEI Y Y, LYU L H, WANG Y H, 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.
- [30] 陈秀琴,刘其全,田新湖,等.草地贪夜蛾生物防治研究进展[J].福建农业学报,2021,36(8):981-988.
CHENG X Q, LIU Q Q, TIAN X H, et al. Progress in biological control of *Spodoptera frugiperda* [J]. Fujian journal of agricultural sciences, 2021, 36(8): 981-988.
- [31] 王妮,姚红青,谢映平,等.一株感染杨尺蠖蛹的病原真菌的分离及鉴定[J].微生物学通报,2016,43(11):2428-2436.
WANG N, YAO H Q, XIE Y P, et al. Isolation and identification of an entomopathogenic fungus isolated from the pupae of *Apocheima cinerarius* [J]. Microbiology China, 2016, 43(11): 2428-2436.
- [32] 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.
ZHENG Y Q, HU H F, FU Y F, 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.
- [33] 何劲,康冀川,雷帮星,等.四株虫生真菌的鉴定及其对小菜蛾的室内毒力[J].植物保护学报,2010,37(4):341-346.
HE J, KANG J C, LEI B X, et al. Identification of four entomogenous fungi and preliminary evaluation on their insecticidal activities to *Plutella xylostella* L. [J]. Journal of plant protection, 2010, 37(4): 341-346.
- [34] 苏锦尧,刘思雨,尹晓波,等.莱氏野村菌 Nr0815 对不同龄期斜纹夜蛾幼虫的毒力[J].云南农业大学学报(自然科学),2018,33(3):416-421.
SU J Y, LIU S Y, YIN X B, et al. The virulence of *Nomuraea rileyi* Nr0815 against the different instars of *Spodoptera litura* larvae [J]. Journal of Yunnan agricultural university (natural science), 2018, 33(3): 416-421.
- [35] 陈峰,王长方,王俊,等.一株金龟子绿僵菌对茶尺蠖的致病力和胞外酶活性[J].中国生物防治学报,2021,37(1):124-129.
CHEN F, WANG C F, WANG J, et al. Pathogenicity and extracellular enzyme activities of *Metarhizium anisopliae* to *Ectropis obliqua hypulina* Wehrli [J]. Chinese journal of biological control, 2021, 37(1): 124-129.
- [36] 雷妍圆,王德森,薛志洪,等.广州地区一株绿僵菌的鉴定及其对草地贪夜蛾的致病力测定[J].南方农业学报,2020,51(6):1265-1273.
LEI Y Y, WANG D S, XUE Z H, et al. Identification of a *Metarhizium* strain and its pathogenicity to *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Guangzhou area [J]. Journal of southern agriculture, 2020, 51(6): 1265-1273.
- [37] BEHESHTI H, KARIMI K. Ethanol and value-added byproducts from rice straw by dimorphic fungus *Mucor hiemalis* [J]. Engineering in life sciences, 2016, 16(8): 750-761.
- [38] MELAKU H, LAKEW M, ALEMAYEHU E, et al. Isolation and identification of pathogenic fungus from African catfish (*Clarias gariepinus*) eggs and adults in national fishery and aquatic life research center hatchery, Ethiopia [J]. Fisheries and aquaculture journal, 2017, 8(3): 1-5.
- [39] 陈健鑫,魏金龙,钱昱含,等.云南香格里拉叉襁科昆虫病原菌的鉴定[J].环境昆虫学报,2021,43(1):122-129.
CHEN J X, WEI J L, QIAN Y H, et al. Identification of *Nemouroides* (Plecoptera) pathogen in Shangri-La, Yunnan [J]. Journal of environmental entomology, 2021, 43(1): 122-129.
- [40] STARK J D, SHERMAN M. Toxicity, penetration, and metabolism of acephate in three fruit fly species (Diptera: Tephritidae) [J]. Journal of economic entomology, 1989, 82(6): 1564-1571.
- [41] 蒲蛰龙,李增智.昆虫真菌学[M].合肥:安徽科学技术出版社,1996:95-99.
PU Z L, LI Z Z. Insect mycology [M]. Hefei: Anhui Science and Technology Press, 1996: 95-99.
- [42] 王燕.冻土毛霉新菌株对韭菜迟眼蕈蚊毒杀活性[D].泰安:山东农业大学,2021.
WANG Y. Poisoning activity of a new strain of *Mucor hiemalis* to *Bradysia odoriphaga* Yang et Zhang [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2021.
- [43] EKESI S, MANIANIA N K, AMPONG-NYARKO K. Effect of temperature on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Megalurothrips sjostedti* [J]. Biocontrol science and technology, 1999, 9(2): 177-185.
- [44] FARGUES J, VIDAL C, SMITS N, et al. Climatic factors on entomopathogenic hyphomycetes infection of *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) in Mediterranean glasshouse tomato [J]. Biological control, 2003, 28(3): 320-331.
- [45] ZHU G D, DING W J, XUE M, et al. Identification and pathogenicity of a new entomopathogenic fungus, *Mucor hiemalis* (Mucorales: Mucorales), on the root maggot, *Bradysia odoriphaga* (Diptera: Sciaridae) [J]. Journal of insect science (Online), 2022, 22(2): 2.