

防治斜纹夜蛾蛹和 2 龄幼虫的棒束孢菌株筛选

许忠顺¹, 薛原², 张丽², 王真娣², 曾召英¹, 杨茂发³, 邹晓^{1*}

(1. 贵州大学生命科学学院真菌资源研究所, 贵阳 550025; 2. 贵州烟草公司安顺市公司, 安顺 561000; 3. 贵州大学农学院昆虫研究所, 贵阳 550025)

摘要 为获取对斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (Fabricius) 具致病力的生防真菌资源, 通过对 8 株寄主为鳞翅目蛹的棒束孢属 *Isaria* spp. 真菌进行形态学和分子系统学鉴定; 以斜纹夜蛾的蛹和 2 龄幼虫为试虫, 分别采用拌土法和浸渍法测试菌株的致病力。结果显示: 菌株 GZUIFR08XS1、GZUIFR04XS8、GZUIFR08XS13 为环链棒束孢 *I. cateinannulata*, 菌株 GZUIFR08LYS4、GZUIFR04XS5、GZUIFR04XS7、GZUIFR08XS12、GZUIFR04XS16 为粉棒束孢 *I. farinose*。8 株菌对斜纹夜蛾的蛹和 2 龄幼虫均有致病力。土壤接种 5 mL 浓度为 2×10^8 个/mL 的分生孢子, 环链棒束孢 GZUIFR08XS1、GZUIFR04XS8 对蛹的致死率均为 100%。接种浓度为 1×10^8 个/mL 的分生孢子, 环链棒束孢 GZUIFR04XS8 对 2 龄幼虫致死率为 $(78.21 \pm 2.22)\%$, 较其他菌株有差异显著 ($P < 0.05$)。将环链棒束孢 GZUIFR04XS8 分别接种在 2~5 龄幼虫时, 对同一龄期幼虫的致死率随接种浓度的增大而上升, 其中, 接种孢子浓度为 1×10^9 个/mL 可致 2 龄幼虫 100% 死亡; 同一接种浓度下, 对幼虫致死率随幼虫龄期的增大而下降, 其中, 2 龄幼虫的致死中浓度 LC_{50} 为 1.28×10^5 个/mL。环链棒束孢 GZUIFR04XS8 有较好防治斜纹夜蛾蛹和低龄幼虫的生防潜力。

关键词 环链棒束孢; 斜纹夜蛾; 生物防治; 拌土法; LC_{50}

中图分类号: S 476 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2019682

Screening of *Isaria* isolates for controlling the pupae and second-instar larvae of *Spodoptera litura*

XU Zhongshun¹, XUE Yuan², ZHANG Li², WANG Zhendi², ZENG Zhaoying¹, YANG Maofa³, ZOU Xiao^{1*}

(1. Institute of Fungus Resources, College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China;
2. Guizhou Tobacco Company Anshun company, Anshun 561000, China;
3. Institute of Entomology, College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract In order to obtain biocontrol fungus resources with high pathogenicity to *Spodoptera litura* (Fabricius), eight isolates of *Isaria* spp. with the pupae of Lepidoptera as their hosts were identified by morphology and molecular systematics. Using pupae and 2nd-instar larvae of *S. litura* as test insects, the pathogenicity of isolates was tested by using soil mixing and dipping methods, respectively. The results showed that the isolates GZUIFR08XS1, GZUIFR04XS8 and GZUIFR08XS13 were *I. cateinannulata*, and the isolates GZUIFR08LYS4, GZUIFR04XS5, GZUIFR04XS7, GZUIFR08XS12 and GZUIFR04XS16 were *I. farinose*. The eight isolates were pathogenic to the 2nd-instar larvae and pupae of *S. litura*. When the soil was inoculated with 5 mL of 2×10^8 spores/mL, and the corrected mortality rate of the pupae of *S. litura* caused by GZUIFR08XS1 and GZUIFR04XS8 was 100%. When 1×10^8 spores/mL were inoculated, the mortality rate of the 2nd-instar larvae caused by GZUIFR04XS8 was $(78.21 \pm 2.22)\%$, which was significantly different from other strains ($P < 0.05$). When the 2nd–5th instar larvae were inoculated with GZUIFR04XS8, the mortality of larvae at the same age increased with increasing inoculation concentration. Inoculation of 1×10^9 spores/mL caused 100% death of 2nd instar larvae. At the same inoculation concentration, the larval mortality decreased with the increase of instar. The LC_{50} value of the 2nd-in-

收稿日期: 2019-12-10 修订日期: 2020-02-28

基金项目: 黔科合重大专项字[2016]3022-07 号; 贵州省农业攻关项目[20192405]; 中国烟草总公司贵州省公司重大科技专项[201603, 201752010040001]; 中国烟草总公司贵州省公司科技项目[201712]

* 通信作者 E-mail: xzou@gzu.edu.cn

star larvae was 1.28×10^5 spores/mL. *I. cateinannulata* GZUIFR04XS8 showed a good biocontrol potential for controlling pupae and young larvae of *S. litura*.

Key words *Isaria cateinannulata*; *Spodoptera litura*; biological control; soil mixing method; LC_{50}

斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (Fabricius), 隶属鳞翅目 Lepidoptera, 夜蛾科 Noctuidae, 别称夜盗虫、莲纹夜蛾、烟草夜蛾等, 是一种分布于热带和亚热带地区的世界性害虫^[1], 可为害果蔬、杂草及园林观赏植物等 100 多科 289 种植物^[2-3]。斜纹夜蛾主要为害虫态为幼虫, 在我国大部分地区, 每年可发生 4~9 代, 从 3 月开始发生可持续到 11 月, 7 月—9 月为害最重, 斜纹夜蛾 1~2 龄幼虫常聚在一起, 取食幼嫩的植物组织, 从 3 龄开始分散取食, 5~6 龄幼虫可蛀食茎秆、花蕾和果实, 容易导致作物绝收, 造成经济损失^[4-6]。据报道, 斜纹夜蛾为害烟草 *Nicotiana tabacum*、西兰花 *Brassica oleracea* var. *italica* 及棉花的经济阈值分别为 0.17、0.5 头/株和 2.6 头/株^[7-9]。斜纹夜蛾高龄幼虫昼伏夜出, 白天藏匿于土缝和草丛, 晚上出来取食, 老熟幼虫常在土壤表层 1~3 cm 处化蛹^[10-12]。目前, 斜纹夜蛾的防治主要以化学农药为主, 农业、物理和生物防治的方式为辅^[13-14]。但化学农药的过度使用, 导致农药残留、次要害虫再猖獗等农业“3R”问题的产生, 直接威胁到人类健康。不同地区的斜纹夜蛾对多种化学农药具有不同程度的抗性, 如对氯氰菊酯的抗性为 148 倍, 对毒死蜱抗性为 129 倍, 对高效氯氰菊酯抗性为 237.9~432.3 倍^[15-16]。甚至对细菌杀虫剂苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis* 也产生了抗性^[17]。基于斜纹夜蛾的危害和抗药性问题, 如何高效绿色地防控斜纹夜蛾成为植保领域关注的焦点。虫生真菌 (entomopathogenic fungi) 主要通过接触害虫体壁的方式感染杀死害虫, 具有易分离培养、能持续控制害虫、对环境友好等优点^[18-20], 在害虫生物防治中发挥着重要的作用。虫生真菌在土壤里广泛存在, 土壤被认为是它们的天然储藏库^[21-23], 施菌处理土壤以防治地下害虫或某发育阶段在土壤中完成的害虫, 被认为是一种有效且可持续的害虫管理策略^[24]。

棒束孢 *Isaria* (异名拟青霉 *Paecilomyces*) 在土壤中广泛存在, 该属中大多数成员是重要的虫生真菌, 在害虫生物防治、医药卫生等诸多方面具有重要作用^[25]。其中粉棒束孢 *I. farinosa* (Holmsk.) Fries 广布于全世界, 能感染鳞翅目、鞘翅目 Coleop-

tera、双翅目 Diptera、半翅目 Hemiptera 等多种昆虫^[26]和蜘蛛^[27], 被广泛应用于害虫生物防治上。环链棒束孢也是棒束孢家族的成员之一, 它的重要作用主要体现在生物防治方面^[28]。研究表明, 环链棒束孢对小菜蛾 *Plutella xylostella*^[29]、褐带长卷蛾 *Homona coffearia*^[30]、细纹新须螨 *Cenopalpus lineola*^[31]、全齿复活线虫 *Panagrellus redivivus*^[32]、菜粉蝶 *Pieris rapae*^[33]、蚜虫^[34]、松墨天牛 *Monochamus alternatus* 幼虫^[35]、二斑叶螨 *Tetranychus urticae*^[36]及烟草粉斑螟 *Ephestia elutella*^[37]等多种害虫具有较好的致死性, 其代谢产物、菌丝提取物及芽生孢子对害虫均有杀伤作用^[30-40]。尽管前人已对粉棒束孢和环链棒束孢进行了大量的研究, 但它们对斜纹夜蛾的防治未见报道。

为此, 本研究在鉴定 8 个菌株的基础上, 结合斜纹夜蛾在土表化蛹的行为特点, 采用土壤接种法测定对蛹的致病力, 并使用浸渍法测试其对 2~5 龄幼虫的致病力。以期对斜纹夜蛾的生物防治提供菌株资源和应用依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株: 试验所用菌株是梁宗琦、刘爱英等分别于 2004 年和 2008 年在云南昆明西山和安徽琅琊山采得, 寄主均为鳞翅目昆虫蛹。其中, 菌株 GZUIFR08LYS4 采自安徽琅琊山, 其余菌株 GZUIFR08XS1、GZUIFR04XS5、GZUIFR04XS7、GZUIFR04XS8、GZUIFR08XS12、GZUIFR08XS13、GZUIFR04XS16 均采自昆明西山。菌株经前期分离纯化后, 保存于贵州大学真菌资源研究所菌种保藏中心 (GZAC)。

供试虫源: 斜纹夜蛾由贵州大学昆虫研究所提供。试验所用幼虫为卵块孵化后采用新鲜的白菜叶饲养所得; 老熟幼虫化蛹后第 2 天供试。

培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (potato dextrose agar, PDA): 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂粉 18 g, 水 1 000 mL, pH 自然。121℃灭菌 30 min。

试剂及仪器: 植物基因组 DNA 抽提试剂盒 (天根生化科技 (北京) 有限公司); GZ-500-HSH 恒温恒湿箱 (韶关市广智科技设备有限公司); BX53 型光学

显微镜(日本奥林巴斯公司);T100 型梯度 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);DYY-10C 型琼脂糖凝胶电泳仪(北京市六一仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 菌株的形态观察

将菌株使用点接法接种至 PDA 平板($d = 90$ mm)中央,培养条件:(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、光照 L//D= 12 h// 12 h、RH 为 65%~75%,2 周后观察菌落特征和显微形态。

1.2.2 菌株的分子系统发育分析

刮取平板菌落菌丝,参照 Tigano-Milanil 等^[41]的方法提取 DNA,送至上海 Invitrogen 公司纯化和测序。测序结果经序列标准化处理后,提交 NCBI 进行 Blast 比对,下载序列相似度大于 95%及已公布的近缘种的 rDNA-ITS 序列,编号见图 3。以 *Tor-rubiella ratticaudata* 作为外群,使用 MEGA 7.0 软件,采用 Clustal X 方法进行序列比对和手工校对,以 Neighbor-Joining 法,设置 1 000 次 Bootstrap 验证,构建 NJ 系统发育树^[42]。

1.2.3 分生孢子悬浮液的制备

选取干净无污染的平板,用手术刀截取菌落至 250 mL 的三角瓶,加入 10 mL 含 0.05% Tween-80 无菌水,加塞后 260 r/min 振荡 10 min,用三层擦镜纸过滤,弃掉菌丝及培养基,收集孢子悬浮液,用血球计数板镜检计数,并调整孢子浓度为 2×10^8 个/mL 和 1×10^8 个/mL 备用。

1.2.4 菌株对斜纹夜蛾蛹的致死率测定

称取烟田土壤 50 g(取自贵州平坝天龙镇烟田, $26^{\circ}22'50''\text{N}$, $106^{\circ}8'6''\text{E}$,海拔 1 330 m。室内自然风干 2 周,过 20 目筛后,去掉植物根系和石块后测含水量为 10.78%、测饱和含水量为 53.22%)装于圆柱形透气塑料盒(盖直径 140 mm,底直径 90 mm,高 70 mm),加入 10 mL 无菌水将土壤均匀润湿,选取大小均一的健康蛹 20 头,用 5 mL 浓度为 2×10^8 个/mL 的孢子悬浮液,浸蛹 10 s(每次处理需更换同体积菌悬液)后,完成浸蛹后的菌悬液与土壤充分混匀形成带菌土,再将虫蛹分散放入,覆上菌土;以等体积含 0.05% Tween-80 无菌水进行如上处理作为空白对照(对照处理也需更换等体积的含 0.05% Tween-80 无菌水),每个菌株处理与对照均重复 3 次。置于(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,RH 为(85 ± 1)%的培养箱,每日记录蛹死亡的数目(用镊子多次触动蛹体均无反

应则为死亡),连续观察 10 d。

1.2.5 菌株对斜纹夜蛾 2 龄幼虫的致病率测定

挑取大小均匀的健康 2 龄幼虫 30 头(浸虫法:将 30 头幼虫一同倒入盛有 10 mL 菌悬液的干净平板,摇晃平板使菌悬液与虫体充分接触,5 s 后迅速将菌悬液和幼虫过滤分开,每次处理需更换同体积菌悬液),以 10 mL 含 0.05% Tween-80 的无菌水为空白对照,菌株处理和对照均重复 3 次(对照处理也需更换同体积无菌 0.05% Tween-80)。处理后的幼虫于室内条件下(试验期间室内平均温度为 25.1°C ,平均空气相对湿度 RH 为 75%,白菜叶表面湿度 $\geq 90\%$)用无农药污染的白菜叶饲喂,定期清理粪便和添加新鲜菜叶,每 12 h 观察记录一次死虫数,96 h 起每 24 h 观察记录一次,全程观测 168 h,观察时发现死亡的试虫挑出保湿培养,待长出白色菌丝并产孢后镜检鉴定。

1.2.6 菌株对斜纹夜蛾的致病力及致死过程观察

将筛选到的菌株,用 1.2.3 的方法获得分生孢子,调整分生孢子悬浮液浓度为 $10^4 \sim 10^9$ 个/mL(梯度间隔 10 倍)。按 1.2.4 和 1.2.5 方法分别接种蛹和幼虫(蛹按最高浓度接种,各龄期幼虫则按浓度梯度接种见表 3)。每日记录试虫死亡数,并将死虫挑出, 25°C 保湿培养,观察斜纹夜蛾被感染过程的形态变化。

1.3 数据统计与分析

致死率和校正致死率用 Excel 2016 进行计算。通过 SPSS 25.0 对校正致死率进行差异显著性检验(Duncan 氏新复极差法);利用曲线估计校正致死率和时间的回归方程,选取拟合度 R^2 较好的拟合曲线及方程,设定半致死率为 0.5,通过拟合方程计算得到半致死时间 LT_{50} 。通过 SPSS 25.0 回归概率估计分析,得到毒力回归方程和半致死浓度 LC_{50} 。

致死率=(死亡虫数/试虫数) $\times 100\%$;

校正致死率=(处理组致死率-对照致死率)/(1-对照致死率) $\times 100\%$ 。

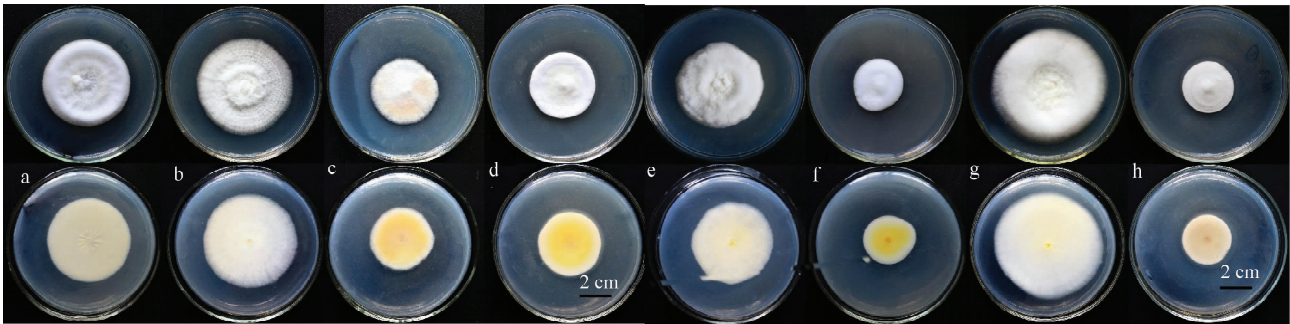
2 结果与分析

2.1 菌株形态

8 个菌株均能在 PDA 培养基上生长, (25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、光照 L//D= 12 h// 12 h 培养 14 d 后菌落形态均似圆形,但菌落颜色及显微形态有所差异(图 1)。其中 GZUIFR08XS1、GZUIFR04XS8、GZUIFR08XS13 菌落

形态近圆形,菌落隆起,正反面均为白色,菌丝初浓密长绒毛状(图 1a、e、g),产孢后粉状;显微形态相似,分生孢子梗轮生,较短,长 6.0~10.2 μm ,2~4 个分支(图 2b),瓶梗基部膨大,椭圆形或柱形(图 2c)(1.8~4.5) $\mu\text{m}\times(1.2\sim2.1)\mu\text{m}$,颈部向上突然变细,(2.9~4.2) $\mu\text{m}\times(0.8\sim1.5)\mu\text{m}$,颈长 2 μm 左右;分生孢子光滑、透明、椭圆形或球形,叠瓦状排列成环(图 2a),形态鉴定为环链棒束孢。GZUIFR08LYS4、GZUIFR04XS5、GZUIFR04XS7、GZUIFR08XS12、GZUIFR04XS16 菌落平展,但颜色有差异,其中

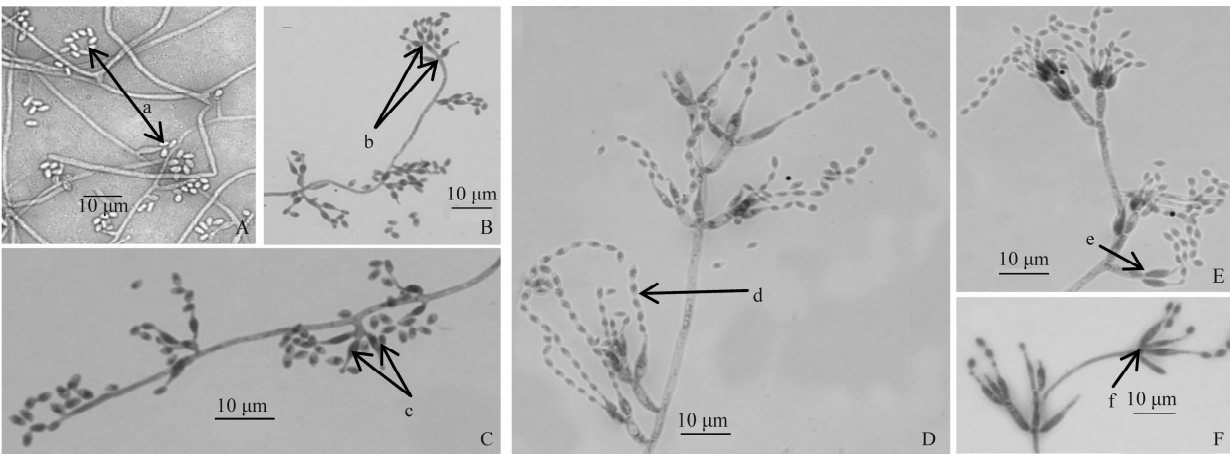
GZUIFR08LYS4 正反面均为白色,菌落稀疏绒毛状;GZUIFR04XS5、GZUIFR04XS16 绒毛状,产孢初为白色,产孢后略带橙色,背面黄色;GZUIFR04XS7、GZUIFR08XS12 菌落绒毛状,白色,背面橙黄色;显微形态相近,大致可概括为分生孢子梗从菌丝发出,较长,(10.4~20.5) $\mu\text{m}\times(1.0\sim2.6)\mu\text{m}$;瓶梗轮生,2~4 个(图 2e、f),瓶梗基部椭圆形膨大,颈部突然变细,(4.8~9.3) $\mu\text{m}\times(1\sim3)\mu\text{m}$,分生孢子透明光滑,(1.8~3.2) $\mu\text{m}\times(1.0\sim2.0)\mu\text{m}$,卵圆形或梭形,多排列成链状(图 2d)。形态鉴定为粉棒束孢。



a、e、g 分别为环链棒束孢 GZUIFR08XS1、GZUIFR04XS8、GZUIFR08XS13; b、c、d、f、h 分别为粉棒束孢 GZUIFR08LYS4、GZUIFR04XS5、GZUIFR04XS7、GZUIFR08XS12、GZUIFR04XS16 在 PDA 培养基上菌落特征(上部为正面,下部为反面)
a、e、g indicate *Isaria cateinannulata* strains GZUIFR08XS1, GZUIFR04XS8, and GZUIFR08XS13, respectively; b、c、d、f、and h indicate the colony characteristics of *I. farinose* strains GZUIFR08LYS4, GZUIFR04XS5, GZUIFR04XS7, GZUIFR08XS12, and GZUIFR04XS16 on the PDA medium (Upper part is the front of colony, and lower part is the back of colony)

图 1 各菌株在 PDA 培养基上的菌落形态

Fig. 1 Colony morphology of each strain on PDA medium



A~C 为环链棒束孢的显微形态, a~c 为产孢结构; D~F 为粉棒束孢的显微形态, d~f 为产孢结构
A-C are the microscopic morphology of *Isaria cateinannulata*, a~c indicate the spore-forming structure; D-F are the microscopic morphology of *I. farinose*, and d~f indicate the spore-forming structure.

图 2 代表菌株 GZUIFR04XS8 和 GZUIFR08XS12 的显微结构

Fig. 2 Microstructures of strain GZUIFR04XS8 and GZUIFR08XS12

2.2 各菌株的分子系统学关系

8 个菌株的 ITS-rDNA 序列长度均为大于 520 bp 的片段, BLAST 比对结果显示, GZUIFR08XS1、GZUIFR04XS8、GZUIFR08XS13 与 *I. cateinannu-*

lata 的相似度为 98%~100%; GZUIFR08LYS4、GZUIFR04XS5、GZUIFR04XS7、GZUIFR08XS12、GZUIFR04XS16 与 *I. farinose* 相似度均超过 99%。基于 ITS-rDNA 序列构建的系统发育树中,

GZUIFR08XS1、GZUIFR04XS8、GZUIFR08XS13 与环链棒束孢菌株 EU363507 聚在一起,支持率为 95%,且与处于同一分支的环链棒束孢菌株 GZ734761 的亲缘关系最近,支持率为 98%(图 3),结合形态学结果最终鉴定为环链棒束孢 *I. cateinannulata*;而菌株 GZUIFR08LYS4、GZUIFR04XS5、GZUIFR04XS7、GZUIFR08XS12、GZUIFR04XS16 与粉棒束孢菌株 MH85775 聚为一支(图 3),且支持率为 100%。结合形态学最终鉴定为粉棒束孢 *I. farinose*。

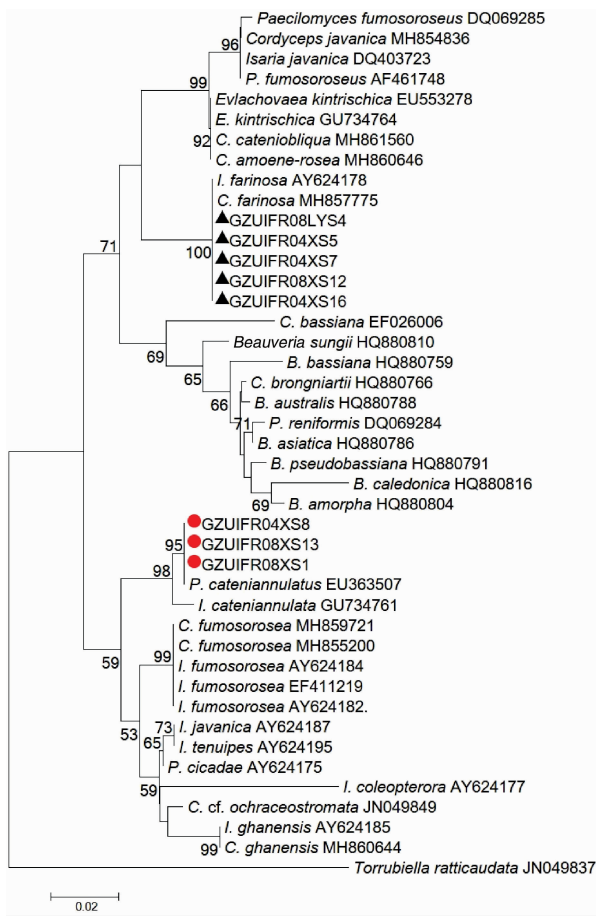


图 3 基于目标菌株及相关菌株 ITS 序列构建的系统发育树
Fig. 3 Phylogenetic tree based on ITS sequences of target isolates and related isolates

2.3 菌株对斜纹夜蛾蛹的致死率

在 5 mL 孢子浓度 2×10^8 个/mL 悬浮液土壤处理下,8 个菌株均具有对斜纹夜蛾蛹的致死效果。从校正致死率随时间的变化趋势(图 4)和半致死时间 LT_{50} (表 1)来看,可将 8 株菌按照对蛹的致死率分为高致死率菌株、中致死率菌株、低致死率菌株 3 个等级,其中高致死率菌株有 5 株,分别为环链棒束孢 GZUIFR08XS1、GZUIFR04XS8、

GZUIFR08XS13 和粉棒束孢 GZUIFR08XS12、GZUIFR04XS16,这 5 株菌中,3 株环链棒束孢的致死率总体高于 2 株粉棒束孢,但它们之间差异不显著,而较另外 3 株粉棒束孢的致死率差异极显著($P < 0.01$),上述 5 株菌对斜纹夜蛾蛹的致死率分别为 100%、100%、97.92%、95.83%、95.83%,半致死时间 LT_{50} 分别为 1.30、1.08、1.99、1.99、1.87 d;粉棒束孢 GZUIFR04XS5、GZUIFR04XS7 为中致死率菌株,致死率分别为 63.89%、69.86%,半致死时间 LT_{50} 分别为 3.73、4.91 d;粉棒束孢 GZUIFR08LYS4 为低致死率菌株,致死率仅有 35.97%。

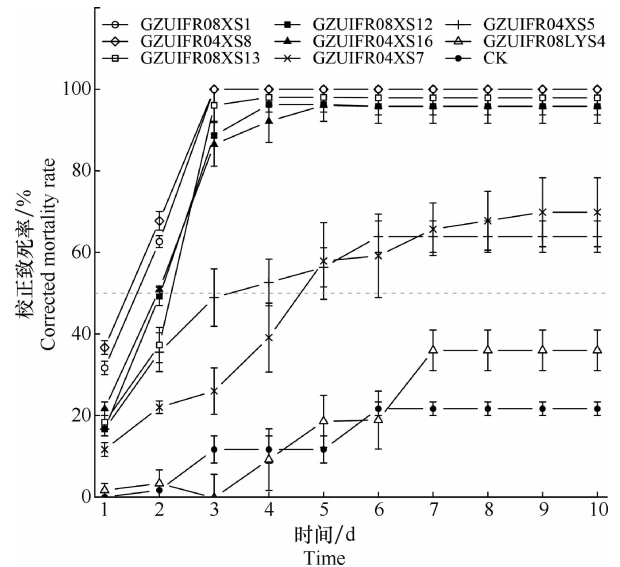


图 4 各菌株接种斜纹夜蛾蛹后累计校正致死率随时间的变化
Fig. 4 Changes in the corrected mortality rates of the pupae of *Spodoptera litura* after inoculation with each strain

2.4 菌株对斜纹夜蛾 2 龄幼虫的致死率

从校正致死率随时间变化趋势和半致死时间差异来看(图 5,表 2),将菌株对斜纹夜蛾 2 龄幼虫致死率分为 3 个区间,即:致死率 $> 60\%$ 、致死率 $50\% \sim 60\%$ 、致死率 $< 50\%$,8 株菌中环链棒束孢 GZUIFR08XS1、GZUIFR04XS8 为 $> 60\%$ 致死率菌株,较其他菌株的致死率差异显著($P < 0.05$),致死率分别为 67.96%、78.21%,半致死时间 LT_{50} 分别为 65.48、63.16 h;粉棒束孢 GZUIFR04XS7、环链棒束孢 GZUIFR08XS13、粉棒束孢 GZUIFR04XS16 为 $50\% \sim 60\%$ 致死率菌株,致死率分别为 56.41%、58.97%、53.85%,半致死时间 LT_{50} 分别为 119.63、98.70、133.79 h;粉棒束孢 GZUIFR08LYS4、GZUIFR04XS5、GZUIFR08XS12 为 $< 50\%$ 致死率菌株。总体上,环链棒束孢菌株对斜纹

夜蛾 2 龄幼虫的致死效果优于粉棒束孢菌株,其中环链棒束孢 GZUIFR04XS8 致死率最高、半致死时间最

短,较其他菌株显著差异($P<0.05$),对斜纹夜蛾 2 龄幼虫的致死效果最佳。

表 1 8 个菌株对斜纹夜蛾蛹的致死率¹⁾

Table 1 Mortality rates of *Spodoptera litura* pupae caused by eight bacterial isolates

菌株号 Strain no.	校正致死率/% Corrected mortality rate	回归方程 Regression equation	R^2	LT ₅₀ /d
GZUIFR08XS1	(100.00±0.00)A	$y=-0.018x^2+0.255x+0.198$	0.829	1.30
GZUIFR04XS8	(100.00±0.00)A	$y=-0.017x^2+0.233x+0.269$	0.822	1.08
GZUIFR08XS13	(97.92±3.61)A	$y=-0.023x^2+0.319x-0.044$	0.825	1.99
GZUIFR08LYS4	(35.97±8.64)C	—	—	—
GZUIFR04XS5	(63.89±6.70)B	$y=-0.01x^2+0.154x+0.065$	0.818	3.73
GZUIFR04XS7	(69.86±14.65)B	$y=-0.008x^2+0.154x-0.063$	0.782	4.91
GZUIFR08XS12	(95.83±3.61)A	$y=-0.021x^2+0.3x-0.002$	0.865	1.94
GZUIFR04XS16	(95.83±7.22)A	$y=-0.02x^2+0.278x+0.05$	0.852	1.87

1) 表中校正致死率均为平均值±标准差;同一列数据后不同字母表示差异极显著(Duncan 氏检验, $P<0.01$)。—;由于致死率低,未测出 LT₅₀。
All the corrected mortality rates in the table are mean value ± standard deviation. Different letters in the same column indicate significant difference (Duncan's test, $P<0.01$); —; LT₅₀ was not determined due to the low mortality.

表 2 8 个菌株对斜纹夜蛾 2 龄幼虫的校正致死率¹⁾

Table 2 The corrected mortality rates of the 2nd-instar larvae of *Spodoptera litura* caused by eight bacterial isolates

菌株号 Strain no.	校正致死率/% Corrected mortality rate	回归方程 Regression equation	R^2	LT ₅₀ /h
GZUIFR08XS1	(67.96±5.88)ab	$y=-0.032x^2+0.349x-0.214$	0.951 2	65.48
GZUIFR04XS8	(78.21±2.22)a	$y=-0.028x^2+0.326x-0.164$	0.951 9	63.16
GZUIFR08XS13	(58.97±5.88)bc	$y=-0.020x^2+0.260x-0.231$	0.898 8	98.70
GZUIFR08LYS4	(37.18±13.51)d	—	—	—
GZUIFR04XS5	(46.15±3.85)cd	—	—	—
GZUIFR04XS7	(56.41±5.88)bc	$y=-0.014x^2+0.204x-0.169$	0.863 7	119.63
GZUIFR08XS12	(46.15±10.18)cd	—	—	—
GZUIFR04XS16	(53.85±3.85)c	$y=-0.011x^2+0.172x-0.117$	0.895 0	133.79

1) 表中校正致死率为平均值±标准差;同一列数据后不同字母表示差异显著(Duncan 氏检验, $P<0.05$)。
Data are mean±SE. Different letters in the same column indicate significant difference (Duncan's test, $P<0.05$).

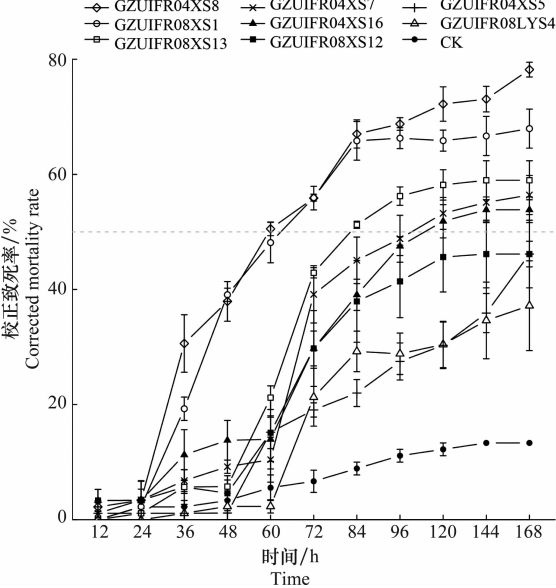


图 5 各菌株接种斜纹夜蛾 2 龄幼虫后累计校正致死率随时间的变化

Fig 5 Changes of the cumulative corrected mortality rates with time after the 2nd instar of *Spodoptera litura* larvae were inoculated with each strain

2.5 环链棒束孢菌株 GZUIFR04XS8 对斜纹夜蛾幼虫的致病力

由表 3 可见:同一龄期的幼虫致死率随着接种浓度的增大而升高,不同接种浓度下幼虫间的致死率差异显著($P<0.05$)。同一接种浓度下幼虫的致死率随着龄期的增大而减小,各虫龄间的致死率差异显著($P<0.05$)。最大接种浓度下,2~5 龄幼虫的致死率均超过 50%,2 龄幼虫致死率为 100%。由表 4 可知,环链棒束孢 GZUIFR04XS8 对不同龄期的斜纹夜蛾幼虫均有较好的致病力,致死中浓度随着虫龄的增大而增大,其中 2 龄幼虫的 LC₅₀ 最小,为 $(1.28\pm0.44)\times10^5$ 个/mL,而 5 龄幼虫的 LC₅₀ 最大,为 $(7.19\pm4.98)\times10^8$ 个/mL。说明高龄幼虫对环链棒束孢菌株 GZUIFR04XS8 敏感性弱,而低龄幼虫对其敏感性强。

2.6 斜纹夜蛾蛹和幼虫被环链棒束孢菌株 GZUIFR04XS8 感染的死亡过程

拌土法接种蛹后,24 h 发现蛹死亡,保湿培养 12~

表 3 环链棒束孢菌株 GZUIFR04XS8 对不同龄期斜纹夜蛾幼虫的校正致死率¹⁾

Table 3 The corrected mortality rates of *Spodoptera litura* larvae of different instars caused by *Isaria cateinannulata* GZUIFR04XS8

接种浓度/个·mL ⁻¹ Inoculation concentration	校正致死率/% Corrected mortality rate			
	2 龄 2nd instar	3 龄 3rd instar	4 龄 4th instar	5 龄 5th instar
1×10 ⁴	(21. 14±1. 82)Af	(18. 16±0. 92)ABe	(14. 56±2. 11)Bf	(5. 56±2. 22)Ce
1×10 ⁵	(30. 54±1. 97)Ae	(22. 68±1. 99)ABe	(20. 19±1. 76)Be	(11. 11±2. 22)Cde
1×10 ⁶	(44. 70±1. 03)Ad	(36. 36±1. 01)Bd	(28. 08±0. 99)Cd	(16. 67±3. 33)Dd
1×10 ⁷	(68. 19±2. 30)Ac	(62. 45±2. 33)ABc	(53. 91±1. 46)Bc	(27. 78±4. 44)Cc
1×10 ⁸	(80. 01±1. 10)Ab	(72. 72±0. 31)Bb	(66. 28±0. 38)Cb	(40. 00±3. 33)Db
1×10 ⁹	(100. 00±0. 00)Aa	(82. 91±2. 12)Ba	(74. 14±1. 29)Ca	(52. 22±2. 94)Da

1) 表中数值为平均值±标准误。同行不同大写字母代表同一接种浓度下不同龄期间的校正致死率经 Duncan 氏新复极差法检验存在显著性差异($P<0.05$);同列不同小写字母代表同一龄期不同接种浓度间的校正致死率经 Duncan 氏新复极差法检验存在显著性差异($P<0.05$)。
Data are mean±SE. Different capital letters in the same row represent significant difference in the corrected mortality among different instars of *S. litura* at the same inoculation concentration by Duncan’s new multiple range test ($P<0.05$); different lowercase letters in the same column represent significant difference in the corrected mortality of the same instar of *S. litura* among different inoculation concentration by Duncan’s new multiple range test ($P<0.05$).

表 4 环链棒束孢 GZUIFR04XS8 对不同龄期斜纹夜蛾幼虫的致死中浓度¹⁾

Table 4 The LC₅₀ values of *Isaria cateinannulata* GZUIFR04XS8 against *Spodoptera litura* larvae of different instars

虫龄 Instar	斜率±标准误 Slope of linear equation	LC ₅₀ /个·mL ⁻¹	95%置信限/个·mL ⁻¹ 95% confidence interval	χ ²
2	0. 542±0. 086	(1. 28±0. 44)×10 ⁵ b	3. 85×10 ⁵ ~3. 49×10 ⁶	3. 328
3	0. 414±0. 068	(4. 32±1. 75)×10 ⁶ b	1. 25×10 ⁶ ~1. 50×10 ⁷	1. 213
4	0. 380±0. 066	(1. 34±0. 57)×10 ⁷ b	3. 87×10 ⁶ ~5. 81×10 ⁷	1. 283
5	0. 337±0. 069	(7. 19±4. 98)×10 ⁸ a	1. 25×10 ⁸ ~2. 16×10 ¹⁰	0. 628

1) 表中数据为平均值±标准误。同列不同小写字母代表不同龄期间的致死中浓度经 Duncan 氏新复极差法检验存在显著性差异($P<0.05$)。
Data are mean±SE. Different lowercase letters in the same column represent significant difference in the median lethal density (LC₅₀) among different instars of *S. litura* by Duncan’s new multiple range test ($P<0.05$).

24 h,从蛹腹部前端和节间膜处长出白色绒毛状菌丝(图 6a)。培养 60~72 h,蛹体全身被白色菌丝覆盖(图 6b),培养 84~96 h 产粉状孢子(图 6c),有的则产生较长的棒状孢梗束(图 6d)。被感染后的幼虫行动迟缓、发育缓慢,死亡后头部仰起身体僵硬(图 6e),虫

体颜色逐渐发黑(图 6f)。保湿培养 10~16 h 多数虫体(2~3 龄死亡的幼虫)表面长出白色菌丝,继续培养 48~72 h,虫体表面长满白色绒毛状菌丝并产生粉状孢子粉(图 6g),有的虫体(4~5 龄死亡的幼虫)表面则覆盖一层厚厚的菌丝,并产生较短的孢梗束(图 6h)。



图 6 斜纹夜蛾幼虫和蛹被环链棒束孢 GZUIFR04XS8 感染后不同时期的症状

Fig. 6 The symptoms of *Spodoptera litura* pupae and larvae during different periods after infected with *Isaria cateinannulata* GZUIFR04XS8

3 讨论

棒束孢属真菌物种丰富,分类复杂,如粉棒束孢同物异名就有多个^[43]。准确鉴定是进一步应用这些资源的基础。结合经典形态学与分子系统学分类可以较好地快速鉴定这些真菌,该类方法在棒束孢属的分类研究已有报道^[44-45]。文中采用此方法,鉴定了8株棒束孢,对斜纹夜蛾蛹和2龄幼虫的生测效果显示环链棒束孢菌株对斜纹夜蛾的生防效果总体优于粉棒束孢菌株,其中,环链棒束孢 GZUIFR04XS8 是防治斜纹夜蛾新的虫生真菌资源。

阿地力江等^[46]用粉棒束孢通过体表接种和土壤接种两种方法感染杨尺蠖 *Apocheima cinerarius* 蛹和幼虫,结果发现两种方法对蛹和幼虫都有较高的致病力。文中研究结果与其类似,大多数菌株对斜纹夜蛾蛹有较高的致死率。季香云^[47]报道了斜纹夜蛾低龄幼虫(1~2龄)接种孢子浓度 1.35×10^8 个/mL 白僵菌,6 d 后开始大量死亡,10 d 后致死率接近 80%,李峰^[48]研究显示莱氏野村菌对斜纹夜蛾表现出较高致病力,孢子浓度 $(0.6 \sim 6.8) \times 10^7$ 个/mL 对的幼虫致死率为 35%~93%,杨恩兰^[49]分别接种 19 株不同的绿僵菌(孢子浓度 1×10^9 个/mL)研究其对斜纹夜蛾的僵死率,发现对斜纹夜蛾 2 龄幼虫平均僵死率最佳达到 66.67%。文中生测效果最佳的环链棒束孢菌株 GZUIFR04XS8 对斜纹夜蛾 2 龄幼虫的致死率为 78.21%,与上述报道真菌的防效相当,但该菌在土壤中对斜纹夜蛾的致死率较高值得关注。Davi 等^[50]认为在自然土壤中能够有效感染昆虫的真菌病原体更有效,因为它能够在环境中长期存在和持续控制害虫。其他研究者也有类似观点^[51]。实际应用中,研究者对看得见的地上虫害的防治关注更多,而对土栖害虫或害虫土栖阶段的控制未充分重视^[52]。Yousef 等^[53]在大面积的田间试验中,结合油橄榄实蝇 *Bactrocera oleae* 老熟幼虫在土壤表层化蛹的行为特点,将棕色绿僵菌 *Metarhizium brunneum* 秋季施于油橄榄园的土壤表层,次年油橄榄实蝇成虫种群密度降低了 70%,该案例说明虫生真菌处理土壤以控制土栖害虫的思路是可行的。

文中筛选对斜纹夜蛾有较好的致死率的链棒束孢菌株 GZUIFR04XS8,其结果是基于稳定的室内环境和白菜表面微环境湿度、土壤含水量充足且接种量较大的条件下取得的。实际应用中面对复杂环

境的田间生态适应性,该菌株在土壤中发挥防效需要结合气象降水、农业灌溉等条件,才能更好地发挥防效;防治低龄幼虫需要更多考虑作物叶片的小环境湿度,利用好叶片的呼吸作用产生的水气和早晚温差叶面产生的冷凝水。此外若该菌要实现产业化应用,其人工培养后毒力的变化、既方便使用又延长货架期剂型化的研究、与化学药剂和其他病原物混合使用的效果等诸多方面还有待深入研究。

参考文献

- [1] RAJPUT S, TARA J S, LANGER S. Bioefficacy of leaf extracts of two medicinal plants *Vitex negundo* and *Justicia adhatoda* against third instar larvae of *Spodoptera litura* (Fab) (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. International Journal of Analytical Chemistry, 2018, 5(4): 353–362.
- [2] 秦厚国,汪笃栋,丁建,等. 斜纹夜蛾寄主植物名录[J]. 江西农业学报, 2006, 18(5): 51–58.
- [3] AHMAD M, GHAFAR A, RAFIQ M. Host plants of leaf worm, *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) in Pakistan [J]. International Journal of Agriculture and Biology, 2013, 1(1): 23–28.
- [4] 范成平,陈恩发,乐俊明,等. 黔中地区烟草斜纹夜蛾发生规律及田间性诱效果[J]. 贵州农业科学, 2018, 46(9): 67–70.
- [5] 钱小兰. 桑园斜纹夜蛾的发生规律与防治方法初探[J]. 江苏蚕业, 2009, 31(3): 34–36.
- [6] 胡涛,洪海林. 十字花科蔬菜主要害虫的防治技术[J]. 湖北植保, 2009(5): 32–33.
- [7] 武承旭,廖启荣,杨茂发,等. 斜纹夜蛾危害烟草的经济损失及防治指标[J]. 贵州农业科学, 2013, 41(7): 95–97.
- [8] 汪恩国,刘伟明. 西兰花苗期斜纹夜蛾发生与防治指标的探讨[J]. 浙江农业科学, 2010(3): 603–605.
- [9] 秦厚国,叶正襄,黄水金,等. 斜纹夜蛾对棉花的为害及防治指标研究[J]. 中国棉花, 2000(4): 24–25.
- [10] 王晓容,李素春,梁关生,等. 泰山 1 号线虫对斜纹夜蛾的致死作用[J]. 仲恺农业技术学院学报, 1994, 7(2): 28–32.
- [11] PARK S H, YU Y S, PARK J S, et al. Biological control of tobacco cutworm, *Spodoptera litura* Fabricius with entomopathogenic nematodes [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2001, 6(2): 139–143.
- [12] YAN Xun, SHAHID-ARAIN M, LIN Yinying, et al. Efficacy of entomopathogenic nematodes against the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. Journal of Economic Entomology, 2020, 113(1): 64–72.
- [13] 陈斌,周小毛,柏连阳,等. 斜纹夜蛾防治研究进展[J]. 江西农业学报, 2008, 23(3): 52–54.
- [14] 罗凯,李泽生,高燕,等. 斜纹夜蛾生物防治研究进展[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(10): 126–129.
- [15] KRANTHI K R, JADHAV D R, KRANTHI S, et al. Insecticide resistance in five major insect pests of cotton in India [J]. Crop Protection, 2002, 21(6): 449–460.

- [16] 郝强. 四川地区斜纹夜蛾的抗药性测定及药剂和温度对实验种群生长发育的影响[D]. 成都:四川农业大学, 2016.
- [17] 潘飞, 秦双, 严春雨, 等. 斜纹夜蛾对15种杀虫剂的抗药性监测[J]. 江西农业大学学报, 2014, 36(5): 1042-1047.
- [18] 蒲蛰龙. 害虫生物防治的原理和方法[M]. 北京:科学出版社, 1984.
- [19] 蒋杰贤, 梁广文, 庞雄飞. 斜纹夜蛾天敌作用的评价[J]. 应用生态学报, 1999, 10(4): 461-463.
- [20] SHAH P A, PELL J K. Entomopathogenic fungi as biological control agents [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 61(5/6): 413-423.
- [21] QUESADA M E, NAVAS-CORTÉS J A, MARANHÃO E A, et al. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils [J]. Mycological Research, 2007, 111(8): 947-966.
- [22] PELL J K, HANNAM J J, STEINKRAUS D C. Conservation biological control using fungal entomopathogens [J]. BioControl, 2010, 55(1): 187-198.
- [23] GARRIDO-JURADO I, FERNÁNDEZ-BRAVO M, CAMPOS C, et al. Diversity of entomopathogenic Hypocreales in soil and phylloplanes of five Mediterranean cropping systems [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2015, 130: 97-106.
- [24] GRABENWEGER G, MAYERHOFER J, JÜRG E, et al. Preventive application of an entomopathogenic fungus in cover crops for wireworm control [J]. BioControl, 2017, 62(5): 613-623.
- [25] 蒲蛰龙, 李增智. 昆虫真菌学[M]. 合肥:安徽科技出版社, 1996.
- [26] ZIMMERMANN G. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control [J]. Biocontrol Science and Technology, 2008, 18(9): 865-901.
- [27] HUANG Bo, WANG Tianshu, FAN Menzhen, et al. Five species of spider-pathogenic fungi [J]. Journal of Anhui Agricultural University, 1999, 26(3): 361-363.
- [28] LUANGSA-ARD J J, HYWEL-JONES N L, MANOCH L, et al. On the relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species [J]. Mycological Research, 2005, 109(5): 581-589.
- [29] 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.
- [30] 王定锋, 杨广, 王庆森, 等. 两株棒束孢菌的鉴定及其对茶卷叶蛾和茶小卷叶蛾的致病力[J]. 植物保护学报, 2014, 41(5): 531-539.
- [31] 李丰伯, 汪传友, 姚剑飞, 等. 环链拟青霉防治黄山风景区细纹新须螨[J]. 东北林业大学学报, 2011, 39(7): 77-78.
- [32] 姚婷, 梁宗琦, 莫明和, 等. 拟青霉云南菌株的杀线虫作用[J]. 中国生物防治, 2006, 22(3): 226-229.
- [33] 刘爱英, 陈月碧, 梁宗琦, 等. 环链拟青霉和玫烟色拟青霉对菜青虫致病条件的研究[J]. 贵州农业科学, 1982(1): 57-59.
- [34] 李丰伯. 环链拟青霉生物学特性、对蚜虫菜青虫的毒力及固体发酵优化研究[D]. 贵阳:贵州大学, 2006.
- [35] 朱新燕. 环链拟青霉的生物学特性和在马尾松林生态系中遗传多样性的研究[D]. 合肥:安徽农业大学, 2007.
- [36] ZHANG Xiaona, GUO Jianjun, ZOU Xiao, et al. Pathogenic differences of the entomopathogenic fungus *Isaria cateniamm-lata* to the spider mite *Tetranychus urticae* (Trombidiformes: Tetranychidae) and its predator *Euseius nicholsi* (Mesostigmata: Phytoseiidae) [J]. Experimental and Applied Acarology, 2018, 75(1): 69-84.
- [37] 周叶鸣, 邹军锐, 张鑫, 等. 一株分离自土壤的蜡蚧菌的鉴定及对烟草粉斑螟的致病性[J]. 昆虫学报, 2018, 61(4): 505-510.
- [38] 任翠娟, 韩燕峰, 张延威, 等. 环链棒束孢菌株发酵液与菌丝提取物对小菜蛾的致死作用[J]. 西南农业学报, 2014, 27(4): 1518-1521.
- [39] 张晓娜, 金道超, 邹晓, 等. 二斑叶螨高致死率虫生真菌菌株的筛选[J]. 贵州农业科学, 2013, 41(7): 98-104.
- [40] 张杰, 王超然, 姚婷. 环链棒束孢 *Isaria cateinammulata* 发酵液的化学成分分析[J]. 菌物学报, 2019, 38(4): 545-559.
- [41] TIGANO-MILANI M S, SAMSON R A, MARTINS I, et al. DNA markers for differentiating isolates of *Paecilomyces lilacinus* [J]. Microbiology, 1995, 141(1): 239-245.
- [42] KUMAR S, TAUMAR K, NEI M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5(2): 150-163.
- [43] 代永东, 虞泓, 杨坤. 1株重寄生真菌粉棒束孢鉴定及系统发育分析[J]. 中国食用菌, 2013, 32(5): 46-52.
- [44] LUANGSA-ARD J J, HYWEL-JONES N L, MANOCH L, et al. On the relationship of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species [J]. Mycological Research, 2005, 109(5): 581-589.
- [45] 韩燕峰. 中国拟青霉属的系统学及部分菌株的致病性研究[D]. 贵阳:贵州大学, 2007.
- [46] 阿地力江, 施登明. 粉拟青霉三级固体培养料的选优[J]. 八一农学院学报, 1995(2): 116-119.
- [47] 季香云. 白僵菌固体发酵及对蔬菜害虫毒力的研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2003.
- [48] 李锋. 菜氏野村菌致病性和生物学特性的研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2002.
- [49] 杨恩兰. 烟田害虫高毒力绿僵菌和混剂筛选及防治效果研究[D]. 广州:华南农业大学, 2016.
- [50] DEVI P S V. Soil treatment with *Nomuraea rileyi*: A promising technique for the control of *Spodoptera litura* on groundnut [J]. Biocontrol Science & Technology, 1995, 5(3): 361-364.
- [51] HOCHBERG, MICHAEL E. The potential role of pathogens in biological control [J]. Nature, 1989, 337(6204): 262-265.
- [52] JACKSON T A, ALVES S B, PEREIRA R M. Success in biological control of soil-dwelling insects by pathogens and nematodes [M] // Biological control: measures of success. Dordrecht: Springer, 2000: 271-296.
- [53] YOUSEF M, ALBA-RAMÍREZ C, GARRIDO J I, et al. *Metarhizium brunneum* (Ascomycota: Hypocreales) treatments targeting olive fly in the soil for sustainable crop production [J/OL]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 1. DOI: 10.3389/fpls.2018.00001.