一株侵染柑橘木虱的球孢白僵菌的分离及鉴定

宋晓兵[1,2]， 彭埃天[1*]， 程保平[1]， 凌金锋[1]， 陈 霞[1]， 张炼辉[2]

(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. 华南农业大学农学院，广东省微生物信号与作物病害防控重点实验室，广州 510640)

摘要 从柑橘木虱虫体分离得到一株具有强致病性的虫生真菌 GZMS-28，本文测定了该菌株对柑橘木虱的致病性，并分析了其 rDNA ITS 基因序列。试验结果表明，该菌株对柑橘木虱具有较强的致病性，浓度为 1.0×10^8 个/mL 的分生孢子悬浮液处理柑橘木虱成虫 7 d 后，其校正死亡率达到 95.7%。菌株 GZMS-28 的培养特征与白僵菌属球孢白僵菌较为一致，其 rDNA ITS 序列与 GenBank 中白僵菌属多个球孢白僵菌菌株的对应序列相似性达到 99%以上，因此将菌株 GZMS-28 鉴定为球孢白僵菌 *Beauveria bassiana*。

关键词 柑橘木虱； 球孢白僵菌； 致病性； 生物防治

中图分类号： S 436.661，S 476.12 **文献标识码：** A **DOI：** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.04.026

Isolation and identification of a *Beauveria bassiana* strain infecting *Diaphorina citri*

Song Xiaobing[1,2]， Peng Aitian[1]， Cheng Baoping[1]， Ling Jinfeng[1]， Chen Xia[1]， Zhang Lianhui[2]

(1. *Research Institute of Plant Protection*, *Guangdong Academy of Agricultural Sciences*, *Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection*, *Guangzhou* 510640, *China*;
2. *Agricultural College of South China Agricultural University*, *Guangdong Province Key Laboratory of Microbial Signals and Disease Control*, *Guangzhou* 510640, *China*)

Abstract The strain GZMS-28 with strong pathogenicity was isolated from *Diaphorina citri* and its pathogenicity against *D. citri* was examined. Its rDNA ITS gene sequence was also analyzed. *D. citri* adults were treated by conidial suspension at the concentration of 1.0×10^8 spores/mL, and the corrected mortality rate was 95.7% after 7 days. The results showed that the strain has a strong pathogenicity against *D. citri*. The study found that the morphological characteristics of the strain were consistent with that of *Beauveria bassiana*. The sequence alignment result showed that the strain GZMS-28 shared 99% homology with the sequences retrieved from GenBank (acc. nos. JX122736, JQ320365, GU565572 and AY531972). According to the morphological characteristics and rDNA ITS sequence analysis, the strain GZMS-28 was identified as *B. bassiana*.

Key words *Diaphorina citri*; *Beauveria bassiana*; pathogenicity; biocontrol

柑橘黄龙病(Huanglongbing)能侵染各种柑橘类植物，是柑橘产业上的毁灭性病害，目前暂无有效的防治药剂，也没有抗病品种可供生产应用[1]。柑橘黄龙病病原(*Candidatus* Liberibacter spp.)是韧皮部限制的革兰氏阴性菌，至今尚未获得广泛认可的纯培养[2]。柑橘黄龙病的人为传播主要通过带病接穗嫁接和带病苗木调运，自然传播主要通过柑橘木虱 *Diaphorina citri*[3-4]。取食病树的柑橘木虱携带黄龙病菌后，再取食健康树完成病菌的传播[5]，病原菌可以在柑橘木虱中肠上皮细胞增殖，后进入血腔继续增殖，再扩散到其他组织，最终到达唾腺[6-9]。

目前对于柑橘木虱多采用化学防治措施，化学农药的频繁使用造成了农药残留、环境污染以及昆虫抗药性等诸多问题，而生物防治被认为是最有效和最具应用前景的防治手段。据统计全世界已记载

收稿日期： 2016-04-11 **修订日期：** 2016-07-16
基金项目： 广东省农业领域引导项目(2013B020309004)；广东省科技计划项目(广东省农作物病虫害绿色防控技术研究开发中心建设)；广东省公益研究与能力建设项目(2014B020203003)；广东省现代农业产业技术体系建设专项(2016LM1077)
* 通信作者 E-mail：pengait@163.com

的虫生真菌大约有 1 000 种[10]，而我国已发现的虫生真菌涵盖 40 多个属 400 多种[11]。虫生真菌是昆虫种群的主要控制因素，自然界中全部病死昆虫中约 60%是由于感染真菌而导致死亡[12]。虫生真菌侵染昆虫的过程主要包括：识别寄主、机械破坏、分泌毒素、干扰代谢等，各种因素的共同作用导致寄主昆虫死亡[13]。本研究通过收集柑橘木虱虫体，进行病原真菌的分离，筛选出对柑橘木虱具有较强致病力的菌株，为利用虫生真菌防治柑橘木虱提供原始材料，对促进柑橘木虱生物防治技术的顺利开展具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

分离虫生真菌所用的柑橘木虱采集于广东省广州市天河区九里香 *Murraya exotica* L. 上，测定病原菌致病性所用的柑橘木虱为本实验室温室中九里香植株上常年继代饲养的种群。

1.2 主要试剂和引物

2×*EasyTaq* PCR SuperMix 购自北京全式金生物技术有限公司，基因组 DNA 提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自爱思进生物技术（杭州）有限公司，用于虫生真菌分离培养的培养基为马铃薯葡萄糖琼脂（PDA）培养基，所用 PCR 引物为扩增真菌 ITS 区域的通用引物 ITS1（5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′）和 ITS4（5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′），由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

1.3 虫生真菌的分离纯化

田间采集柑橘木虱在超净工作台上进行分离操作，将木虱成虫浸于 70%乙醇中消毒 30 s，然后用 0.1%升汞消毒 1.5 min，再用灭菌水漂洗 3 次，用灭菌滤纸吸干木虱虫体上的水分，然后放置于 PDA 平板中。在 27℃恒温培养箱中培养 2～3 d，至虫体周围长出菌丝后，挑取菌丝转至新的 PDA 平板上，如此重复 3 次，然后用稀释纯化法对病菌进行单菌落分离。最终将分离纯化的菌株保存于 PDA 斜面培养基上，置于 4℃冰箱保存。

1.4 菌株的致病性测定

将分离纯化的菌株接种到 PDA 平板上，于 27℃恒温条件下培养 10 d 后，以灭菌水洗脱菌落上的分生孢子，制备成分生孢子悬浮液，用血球计数板确定孢子悬浮液的浓度，以灭菌水进行系列稀释，获得浓度分别为 1.0×10^4、1.0×10^5、1.0×10^6、1.0×10^7 和 1.0×10^8 个/mL 的分生孢子悬浮液，并向其中加入终浓度为0.1%的吐温 80。参照文献[14]的接种方法，取健康柑橘木虱成虫浸于不同浓度的分生孢子悬浮液中 10～15 s，挑取处理后仍能活动自如的柑橘木虱放置于九里香幼嫩叶片上，然后置于 27℃光照培养箱中（L∥D＝14 h∥10 h，湿度 95%以上）培养。上述各处理重复 3 次，每个重复为 30 头柑橘木虱，设含 0.1%吐温 80 的灭菌水处理的柑橘木虱为空白对照。培养 3 d 后开始观察病菌对柑橘木虱的侵染和致死情况，记录柑橘木虱的死亡数量，计算死亡率和校正死亡率，死亡率（%）＝[（总虫数－存活虫数）/总虫数]×100，校正死亡率（%）＝[（处理死亡率－对照死亡率）/（1－对照死亡率）]×100，最后利用 DPS 软件对所得数据进行回归分析。

1.5 菌株形态特征

将菌株接种到 PDA 平板中央，置于 27℃恒温培养箱培养，定期观察菌落生长情况，并记录菌落颜色和形态，在光学显微镜下观察菌丝和孢子形态。

1.6 ITS 序列鉴定

将菌株接种至 PD 培养液，于 27℃恒温振荡培养 5 d，以灭菌滤纸过滤菌液，取适量菌丝于灭菌研钵中，加入液氮研磨至粉末状，采用试剂盒法提取菌株总 DNA。以提取的 DNA 为模板，利用通用引物 ITS1 和 ITS4 扩增菌株的 rDNA ITS 序列。PCR 反应体系：DNA 模板 1 μL，2×*EasyTaq* PCR SuperMix 12.5 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 1.0 μL，用 ddH_2O 补足至总体积 25 μL。反应条件为：95℃ 6 min；94℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 50 s，35 个循环；72℃ 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳观察并拍照。

1.7 测序及序列分析

于琼脂糖凝胶上割取 PCR 产物的目的条带，利用 DNA 凝胶回收试剂盒回收纯化，然后交由 Invitrogen 公司利用引物 ITS1/ITS4 进行两端测序。利用 DNAStar 软件对所获得的目的基因序列进行比较分析，然后利用 BLAST 进行序列相似性比对，采用 MEGA 5.05 软件的邻接法构建系统发育进化树。

2 结果与分析

2.1 菌株致病性测定

通过筛选获得 1 株对柑橘木虱具有强致病力的菌株，命名为 GZMS-28。试验结果表明，接种的分

生孢子悬浮液浓度越高，对柑橘木虱的致死效果越好，菌株 GZMS-28 对柑橘木虱的 LT_{50} 和 LT_{90} 也越短。浓度为 1.0×10^4 个/mL 的分生孢子悬浮液对柑橘木虱的 LT_{50} 为 10.03 d，而浓度为 1.0×10^8 个/mL 的分生孢子悬浮液的 LT_{50} 仅为 2.51 d；浓度为 1.0×10^4 个/mL 的分生孢子悬浮液对柑橘木虱的 LT_{90} 为 33.37 d，而浓度为 1.0×10^8 个/mL 的分生孢子悬浮液的 LT_{90} 仅为 5.28 d（表 1）。

表 1　球孢白僵菌不同孢子浓度对柑橘木虱的毒力测定结果

Table 1　Virulence test of *Beauveria bassiana* with different spore concentrations against *Diaphorina citri*

孢子浓度/个·mL^{-1} Concentration	毒力回归方程 Toxicity regression equation	LT_{50}/d	LT_{90}/ d	相关系数（r） Correlation coefficient
1.0×10^4	$Y=2.541\ 04+2.455\ 34X$	10.03	33.37	0.996 5
1.0×10^5	$Y=2.923\ 84+2.287\ 26X$	8.09	29.38	0.987 0
1.0×10^6	$Y=3.171\ 56+2.443\ 40X$	5.60	18.74	0.999 2
1.0×10^7	$Y=3.382\ 31+2.616\ 13X$	4.15	12.83	0.998 1
1.0×10^8	$Y=3.408\ 85+3.973\ 93X$	2.51	5.28	0.999 5

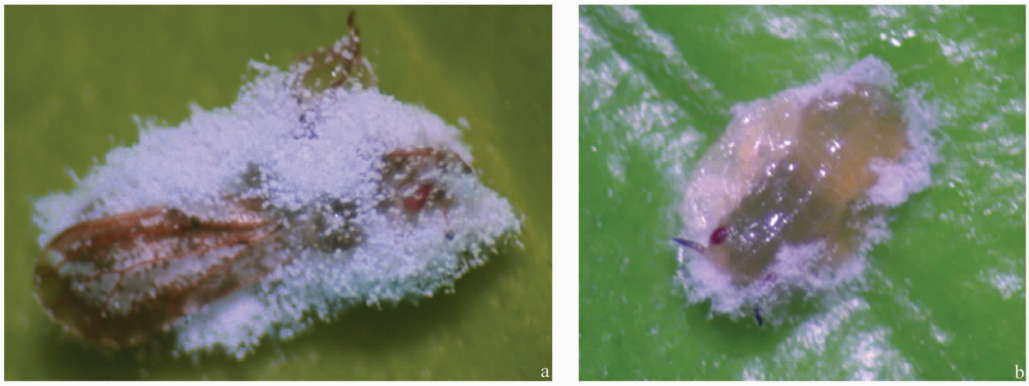
接种后孵育时间越长，柑橘木虱成虫的死亡率越高，菌株 GZMS-28 对柑橘木虱的 LD_{50} 和 LD_{90} 也越小。接种后 3 d，菌株 GZMS-28 对柑橘木虱的 LD_{50} 为 3.43×10^7 个/mL，接种后 7 d 仅为 2.16×10^5 个/mL，接种后 10 d 则仅为 1.36×10^4 个/mL；接种后 3 d，菌株 GZMS-28 对柑橘木虱的 LD_{90} 为 5.63×10^{10} 个/mL，接种后 7 d 仅为 2.14×10^8 个/mL，接种后 10 d 则仅为 3.05×10^7 个/mL（表 2）。

表 2　不同孵育时间下球孢白僵菌对柑橘木虱的毒力测定结果

Table 2　Virulence test of *Beauveria bassiana* at different incubation times against *Diaphorina citri*

孵育时间/d Incubation time	毒力回归方程 Toxicity regression equation	LD_{50}/个·mL^{-1}	LD_{90}/个·mL^{-1}	相关系数（r） Correlation coefficient
3	$Y=1.997\ 04+0.398\ 55X$	3.43×10^7	5.63×10^{10}	0.977 2
7	$Y=2.716\ 55+0.428\ 00X$	2.16×10^5	2.14×10^8	0.971 5
10	$Y=3.417\ 88+0.382\ 61X$	1.36×10^4	3.05×10^7	0.973 7

试验结果表明，经 1.0×10^4 个/mL 的孢子悬浮液处理柑橘木虱成虫后 3 d 的校正死亡率为 11.0%，处理后 7 d 的校正死亡率达 31.8%；经 1.0×10^8 个/mL 的孢子悬浮液处理柑橘木虱成虫后 3 d 的校正死亡率为 62.0%，处理后 7 d 的校正死亡率达 95.7%。试验处理后 2 d，利用体视显微镜观察，在一些柑橘木虱虫体表观察到真菌的菌丝，处理后 7 d，肉眼可见菌株 GZMS-28 的产孢结构，试验中还发现菌株 GZMS-28 对柑橘木虱若虫也具有侵染性（图 1）。



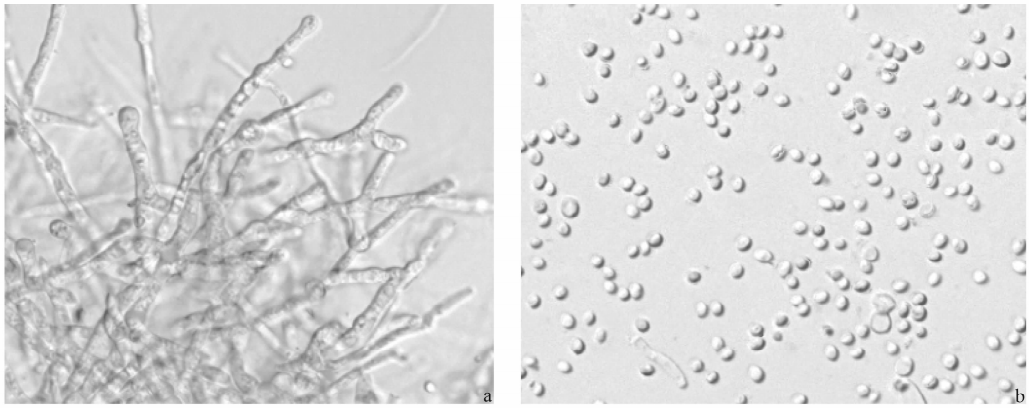
a: 菌株GZMS-28侵染的柑橘木虱成虫; b: 菌株GZMS-28侵染的柑橘木虱若虫
a: Citrus psyllid adult infected by the strain GZMS-28; b: Citrus psyllid nymph infected by the strain GZMS-28

图 1　菌株 GZMS-28 对柑橘木虱若虫及成虫的侵染

Fig. 1　The strain GZMS-28 infecting citrus psyllid nymph and adult

2.2 菌株培养特性和形态特征

菌株 GZMS-28 在 PDA 培养基上于 27℃恒温条件培养，其菌落为乳白色絮状，菌落蓬松、呈放射状生长，圆形或不规则形，菌丝生长较慢，但产孢速度较快，后期菌落背面呈淡黄色。菌株产孢细胞轮生或单生，分生孢子梗向顶部轴式产孢，形成弯曲的具有凸起的产孢轴。分生孢子透明，球形或卵形，壁薄，大小为 2.5 μm×3.5 μm(图 2)。



a: 分生孢子梗; b: 分生孢子
a: Conidiophore; b: Conidia

图 2 菌株 GZMS-28 在光学显微镜下的形态特征(目镜×物镜=10×40 倍)

Fig. 2 Morphological characteristics of the strain GZMS-28 under an optical microscope(400×)

2.3 菌株序列分析

经琼脂糖凝胶电泳检测，利用通用引物 ITS1/ITS4 扩增的 PCR 产物大小为 570 bp 左右。测序后用 NCBI BLAST 进行在线比对，菌株 GZMS-28 的 rDNA ITS 序列与 GenBank 数据库中多个球孢白僵菌菌株的对应序列(GenBank No. JX122736，JQ320365，GU565572，AY531972 等)的相似性高达 99%。在系统发育树中，菌株 GZMS-28 与 *Beauveria bassiana* 的多个分离物聚为 1 个分支，而宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* 的菌株(GenBank No. AY753335)则单独聚为另外 1 个分支(图 3)。

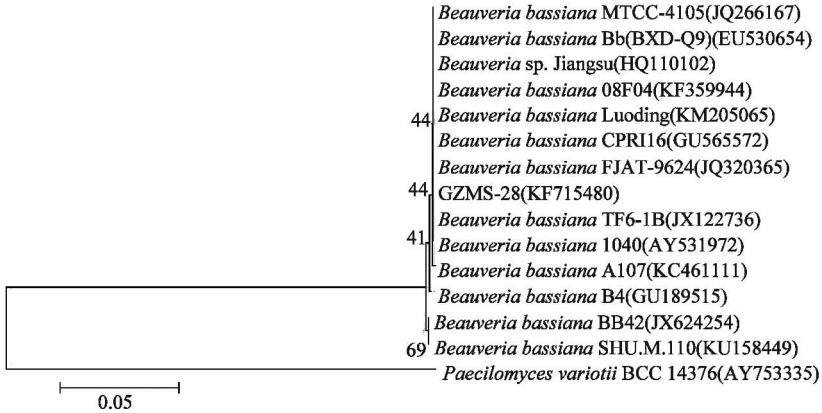


图 3 基于 rDNA ITS 序列构建的菌株 GZMS-28 和其他球孢白僵菌的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of GZMS-28 isolate and other *Beauveria bassiana* based on rDNA ITS sequences

根据菌株 GZMS-28 的培养特性、形态特征及 rDNA ITS 的序列分析，可将所分离的菌株鉴定为白僵菌属的球孢白僵菌。在分类地位上属于半知菌亚门 Deuteromycotina，丝孢纲 Hyphomycetes，丛梗孢目 Moniliales，丛梗孢科 Moniliaceae，白僵菌属 *Beauveria*，球孢白僵菌 *Beauveria bassiana*，GenBank 登录号为 KT715480。

3 小结与讨论

球孢白僵菌是一种重要的昆虫病原真菌，对环境和脊椎动物无害，其杀虫谱广，致病性强，是目前国内应用最广泛的昆虫病原真菌，但工业化、标准化

及剂型加工等方面进展缓慢[15]。张艳璇等通过室内毒力试验发现球孢白僵菌对柑橘木虱具有强致死作用，1.0×10^4个/mL 的孢子悬浮液作用第 10 天，柑橘木虱累计校正死亡率为 92.68%[16]。利用胡瓜钝绥螨搭载白僵菌控制柑橘木虱，在两者共同作用下柑橘木虱卵和成虫 3 d 后的死亡率和患病率分别为 98.4%和 98.8%，对低龄若虫的感染率高达 100%[17]；Lezamagutiérrez 等测定了球孢白僵菌对柑橘木虱的致病力，结果显示，球孢白僵菌对柑橘木虱成虫的致死率为 42%，对柑橘木虱若虫的致死率为 40%[18]。Pinto 等测定了球孢白僵菌对柑橘木虱若虫的致死浓度及其与杀虫药剂的兼容性，结果表明，侵染 10 d 后的 LC_{50}为 0.4×10^7 个/mL，LC_{90}为 6.7×10^7 个/mL，在温室条件下，杀虫药剂不影响球孢白僵菌在柑橘上的定殖[19]。

球孢白僵菌对昆虫寄主的侵染是机械压力和酶共同作用的结果[20]，前人研究表明，在孢子萌发和侵入时需要多种酶类来降解昆虫表皮，包括蛋白质酶、几丁质酶、酯酶、脂酶以及淀粉酶，其中蛋白质酶和几丁质酶被认为是与侵染相关的主要酶类[21-23]。球孢白僵菌中的几丁质酶基因 *Bbchit* 1 和 *Bbchit* 2 已被克隆，高效表达几丁质酶基因 *Bbchit* 1 能显著提高球孢白僵菌的毒力，重组菌株的致死中时 LT_{50} 和致死中浓度 LC_{50}均显著低于野生型菌株[24]，而且双价基因工程菌的毒力高于 Bbchit 1 的工程菌株[25-27]。利用基因工程技术获得高效、稳定的工程菌株，将增强球孢白僵菌对柑橘木虱的毒力、对环境的适应性、延长孢子储藏期，对促进球孢白僵菌杀虫剂商品化生产和应用具有重要意义。

在真菌分类体系中白僵菌一直属于半知菌亚门，丝孢纲，丛梗孢目，丛梗孢科，白僵菌属[28]，本文仍沿用了传统的白僵菌分类体系。随着对白僵菌分子进化和系统发育的研究，将白僵菌归类于双核亚界，子囊菌门，盘菌亚门，粪壳菌纲，肉座菌亚纲，肉座菌目，虫草菌科，虫草属[29]。Rehner 等对不同国家和地区的 86 株白僵菌进行了 ITS 和延长因子的分析，将白僵菌分为 6 个进化支，分别为 A：球孢白僵菌，包括有性和无性型球孢白僵菌；B：布氏白僵菌；C：无性型且源自欧洲和北美洲的球孢白僵菌；D：苏格兰白僵菌和蠕孢白僵菌；E：无性型和有性型且源自亚洲的白僵菌；F：多形白僵菌[30]。

本文测定了球孢白僵菌菌株 GZMS-28 对柑橘木虱的致病性，该菌株产孢速度快，致死率高，具有较好的生防潜力。菌株的产孢条件、孢子萌发率、生长速率等生物学特性需要进一步研究，尤其是菌株的田间应用效果有待试验，未来可将其开发成优良的生防菌制剂，促进柑橘木虱虫生真菌杀虫剂的产业化进程。

参考文献

[1] 宋晓兵，彭埃天，陈霞，等. 柑橘黄龙病病原培养及分子检测技术研究进展[J]. 广东农业科学，2013(23)：65－69.

[2] Davis M J. Fastidious phloem-limited bacteria [M]// Schaad N W, Jones J B, Chun W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN. 2001：275－282.

[3] 杜丹超，鹿连明，张利平，等. 柑橘木虱的防治技术研究进展[J]. 中国农学通报，2011，27(25)：178－181.

[4] Cen Yijing, Zhang Lina, Xia Yulu, et al. Detection of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' in *Cacopsylla* (*Psylla*) *citrisuga* (Hemiptera：Psyllidae)[J]. Florida Entomologist, 2012, 95(2)：303－309.

[5] Grafton-Cardwell E E, Stelinski L L, Stansly P A. Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of the huanglongbing pathogens [J]. Annual Review of Entomology, 2013, 58：413－432.

[6] 黄炳超，刘秀琼，陈循渊. 柑橘木虱传播柑橘黄龙病菌的研究[J]. 华南农业大学学报：自然科学版，1985，6(4)：46－50.

[7] 许长藩，李开本，柯冲，等. 木虱传播柑橘黄龙病及电镜检验报告[J]. 植物病理学报，1985，15(4)：241－245.

[8] 许长藩，夏雨华，李开本，等. 柑橘木虱传播黄龙病的规律及病原在虫体内分布的研究[J]. 福建农业学报，1988，3(2)：57－62.

[9] 姜林蕙. 柑橘黄龙病在柑橘木虱体内的增殖与分布[D]. 台北：台湾大学，2005：1－43.

[10] Lomer C J, Bateman R P, Johnson D L, et al. Biological control of locusts and grasshoppers[J]. Annual Review of Entomology, 2001, 46(1)：667－702.

[11] Li Zengzhi. Fifty years of application of entomogenous fungi in China [J]. 安徽农业大学学报，2007，34(2)：203－207.

[12] Roberts D W, Humber R A. Entomogenous fungi [M]// Cole G T, Kendrick B. Biology of conidial fungi. New York：Academic Press, 1981：201－236.

[13] Clarkson J M, Charnley A K. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects [J]. Trends in Microbiology, 1996, 4(5)：197－203.

[14] 鹿连明，杜丹超，胡秀荣，等. 一株柑橘木虱虫生真菌的分离与鉴定[J]. 浙江农业科学，2013(10)：1319－1322.

[15] 林海萍，韩正敏，张昕，等. 球孢白僵菌研究现状及提高其杀虫效果展望[J]. 浙江林学院学报，2006，23(5)：575－580.

[16] 张艳璇，孙莉，林坚贞，等. 白僵菌 CQBb111 菌株对柑橘木虱

和胡瓜新小绥螨的毒力差异[J]. 中国生物防治学报，2013，29(1)：56－60.

[17] 张艳璇，孙莉，林坚贞，等. 利用捕食螨搭载白僵菌控制柑橘木虱的研究[J]. 福建农业科技，2011(6)：72－74.

[18] Lezamagutiérrez R，Molinaochoa J，Chávezflores 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.

[19] Pinto A P F，Batista Filho A，Wenzel I M. *Beauveria bassiana* pathogenicity to *Diaphorina citri* and compatibility of the fungus with phytosanitary products[J]. Pesquisa Agropecuária Brasileira，2012，47(12)：1673－1680.

[20] 季香云，杨长举. 白僵菌的致病性与应用[J]. 中国生物防治，2003，19(2)：82－85.

[21] 胡景江，樊美珍. 球孢白僵菌胞外蛋白酶与其毒力的关系[J]. 安徽农业大学学报，1996，23(3)：273－278.

[22] 姚剑，李增智，樊美珍. 虫生真菌入侵过程中酶的作用[J]. 安徽农业大学学报，1996，23(3)：308.

[23] 杨怀文. 我国农业病虫害生物防治进展. 迈入21世纪的中国生物防治[M]. 北京：中国农业科技出版社，2005：1－5.

[24] Fang Weiguo，Leng Bo，Xiao Yuehua，et al. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bbchit*1 and its application to improve fungal strain virulence [J]. Applied & Environmental Microbiology，2005，71(1)：363－370.

[25] 冯静. 几丁酶-蛋白酶融合基因的构建与球孢白僵菌毒力的提高[D]. 重庆：西南大学，2006：34－38.

[26] Fan Yanhua，Fang Weiguo，Xiao Yuehua，et al. Directed evolution for increased chitinase activity [J]. Applied Microbiology and Biotechnology，2007，76(1)：135－139.

[27] 郭书娟. 利用家蚕几丁质酶 Bmchi 提高球孢白僵菌的毒力[D]. 重庆：西南大学，2007：38－41.

[28] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海：科学技术出版社，1979：405－487.

[29] 高红，张冉，万永继. 白僵菌的分类研究进展[J]. 蚕业科学，2011，37(4)：730－736.

[30] Rehner S A，Buckley E. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1－α sequences：evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs [J]. Mycologia，2005，97(1)：84－98.

（责任编辑：杨明丽）

（上接133页）

这也是本研究引入常规 PCR 预扩增，以模拟带菌土壤含菌量的对数为横坐标，以预扩增产物为模板进行 qPCR 的 *Ct* 值为纵坐标构建土壤病原真菌荧光定量 PCR 标准曲线，实现 4×10^2 spore/g 的土壤病原真菌 qPCR 检测下限的理论依据。

4 结论

本研究通过引入常规预 PCR 扩增包含 qPCR 目的序列的片段，提高模板 DNA 浓度并降低模板中腐殖酸等杂质的相对含量，成功地以带菌土壤 DNA 为模板构建了 qPCR 标准曲线，较未引入预 PCR 扩增前提高检测下限 10 倍，实现荧光定量 PCR 对土壤病原菌数量为 $4\times10^2\sim4\times10^6$ spore/g 的有效定量检测，结合不同土壤病原真菌的特异性引物，该检测方法可为土壤病原真菌的有效定量检测提供理论支撑。

参考文献

[1] 李洪连，黄俊丽，袁红霞. 有机改良剂在防治植物土传病害中的应用[J]. 植物病理学报，2002，32(4)：289－295.

[2] Higuchi R，Dollinger G，Walsh P S，et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences [J]. Nature Biotechnology，1992，10(4)：413－417.

[3] Bustin S A，Mueller R. Real-time reverse transcription PCR（qRT-PCR）and its potential use in clinical diagnosis [J]. Clinical Science，2005，109(4)：365－379.

[4] 陈旭，齐凤坤，康立功，等. 实时荧光定量 PCR 技术研究进展及其应用[J]. 东北农业大学学报，2010，21(8)：148－155.

[5] 魏锋，余真真，商文静，等. 土壤大丽轮枝菌微菌核的快速定量检测[J]. 植物病理学报，2013，43(5)：449－457.

[6] 王淑芳，马桂珍，暴增海，等. 辣椒疫霉菌（*Phytophthora capsici*）实时荧光定量检测方法的研究[J]. 作物杂志，2012(5)：30－35.

[7] 肖蕊，余真真，Elsharawy A A，等. 土壤中棉花黄萎病菌 SYBR Green Ⅰ荧光 RT-PCR 定量检测技术研究[J]. 菌物学报，2011，30(4)：598－603.

[8] 赵裕栋，周俊，何璟. 土壤微生物总 DNA 提取方法的优化[J]. 微生物学报，2012，52(9)：1143－1150.

[9] Yeates C，Gillings M R，Davison A D，et al. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification [J]. Biological Procedures Online，1998，1(1)：40－47.

[10] 李瑞琴，刘星，邱慧珍，等. 发生马铃薯立枯病土壤中立枯丝核菌的荧光定量 PCR 快速检测[J]. 草业学报，2013，22(5)：136－144.

[11] 赵爽，罗佳，凌宁，等. 基因宏阵列和荧光定量 PCR 方法对西瓜枯萎病害土壤中尖孢镰刀菌的快速检测和定量[J]. 土壤学报，2010，47(4)：703－708.

[12] 韩宝坤，杜艳华. 非无菌操作下分离尖孢镰刀菌的培养基[J]. 植物病理学报，2001，31(4)：373.

（责任编辑：杨明丽）