一株平沙绿僵菌的鉴定及生防应用潜力评价

杨 帆， 刘春来， 王 爽， 刘 亮， 李新民*

（黑龙江省农业科学院植物保护研究所，农业部哈尔滨作物有害生物科学观测实验站，哈尔滨 150086）

摘要 利用大蜡螟诱集法，从黑龙江地区不同类型土样中筛选分离到一株虫生真菌 FZZ 菌株，经形态学及 18S rDNA ITS 序列分析鉴定为平沙绿僵菌 *Metarhizium pingshaense*（KY419576）。通过对平沙绿僵菌 FZZ 菌株的生物学特性、其对小菜蛾 *Plutella xylostella* 2 龄幼虫的致病性及对 7 种植物病原菌的抑菌活性的研究结果表明，FZZ 菌株菌丝生长的最适温度为 25℃，产孢的最适温度范围为 20～25℃，30℃孢子萌发率最高，但 48 h 也仅为 48%。浓度为 1.0×10^9 个/mL 的孢子悬浮液处理小菜蛾 2 龄幼虫，5 d 后校正累计侵染率为 78.33%。FZZ 菌株对 7 株植物病原菌菌丝生长均有不同程度的抑制作用，对水稻稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae* 菌丝抑制率最高，达 45.45%，对大豆根腐病菌 *Fusarium oxysporum* 的抑制率最低，为 36.31%。FZZ 菌株发酵滤液对番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 有较强抑菌活性，抑菌带宽直径达 2.93 cm，对其余 6 种病原菌未表现出抑制效果。此结果对筛选高效平沙绿僵菌及扩大其生防范围具有重要意义。

关键词 平沙绿僵菌； 生物学特性； 致病力； 抑菌作用

中图分类号： S 476.1 **文献标识码**： A **DOI**： 10.16688/j.zwbh.2017467

Identification of *Metarhizium pingshaense* and assessing potentiality of bio-control application

YANG Fan， LIU Chunlai， WANG Shuang， LIU Liang， LI Xinmin

（*Plant Protection Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences*, *Scientific Observing and Experimental Station of Crop Pest in Harbin*, *Ministry of Agriculture*, *Harbin* 150086, *China*）

Abstract An entomopathogenic fungal strain FZZ isolated from infected *Galleria mellonella* larvae was identified as *Metarhizium pingshaense* by morphological and molecular methods. Study on biological characteristics of the isolate showed that the optimum temperature for mycelium growth was 25℃. The range of optimum temperature for conidia production was from 20℃ to 25℃. The most suitable temperature for conidia germination was 30℃ with the germination rate of 48% at 48 h. The virulence of *M. pingshaense* strain FZZ against the second instar larvae of *Plutella xylostella* was investigated in the laboratory. The corrected accumulative infection rate reached 78.33% after 5 days treatment at a concentration of 1.0×10^9 conidia/mL suspension. The inhibition activity of strain FZZ against 7 species of plant pathogenic fungi showed that the highest inhibition rate on mycelium growth of *Magnaporthe oryzae* was 45.45% and the lowest inhibition rate on mycelium growth of *Fusarium oxysporum* was 36.31%. Only the fermented filtrated of strain FZZ had inhibition against mycelium growth of *Botrytis cinerea*, with the inhibition zone diameter of 2.93 cm. No inhibition effects were found in FZZ on other six pathogens. The results showed the great importance for screening *M. pingshaense* with high antagonistic activity and enlarging its biological control targets.

Key words *Metarhizium pingshaense*； biological characterstics； virulence； antimicrobial effect

虫生真菌是重要的生物防治资源，其在农、林、卫生害虫生物防治方面发挥了重要作用。绿僵菌属 *Metarhizium*（Metsch.）Sorokin 真菌是最早用于生物防治的虫生真菌之一，广泛应用于农林害虫的防治[1-4]。大量研究表明，虫生真菌无论分离自土壤还是昆虫罹病体，不同生境条件下分离获得的同一

收稿日期： 2017-12-11 **修订日期**： 2018-02-05
基金项目： 黑龙江省农业科学院农业科技创新工程(2014QN009)；国家重点研发计划(2017YFD0201108)
* 通信作者 E-mail: xinmin63@163.com

种类的菌株间在数量和致病性等方面存在着显著差异。这就使得研究者要对所获得的菌株进行常规筛选,以便得到指标优良的菌株。

马丽娟等对从土壤中分离到的金龟子绿僵菌中生长性状较好的6个菌株进行生物学研究及生物测定,筛选出2株菌株具有进一步研究价值[5]。赵俊生等田间应用绿僵菌防治小菜蛾 *Plutella xylostella*、菜青虫 *Pieris rapae* 和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 等鳞翅目幼虫取得一定效果[6]。Uijan 等报道了绿僵菌属真菌可在实验室内、温室内及田间防治棉粉蚧 *Phenacoccus solenopsis*[7]。长期以来,对于绿僵菌的研究除了基础生物学特性和分子生物学研究外,主要集中在害虫防治方面,多数菌株通过罹病虫体分离和土壤诱集获得。调查发现,多数情况下绿僵菌在农田耕地及周边草地相对容易获得,可能较适应于常被扰动的土壤环境[8]。在加拿大和丹麦都发现,从农田分离到绿僵菌的几率比林地要高得多[9]。

近年来借助分子标记证实,虫生真菌在自然界里除了对靶标害虫具有致病性外,还表现出在土壤根际的定殖、促生作用[10-12]以及对植物病原菌的拮抗作用[13]。齐永霞等发现金龟子绿僵菌对棉花枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* 和小麦纹枯病菌 *Rhizoctonia cerealis* 菌丝生长有较好的抑制作用[14-15]。陈方新等研究发现金龟子绿僵菌孢子悬浮液和代谢产物对玉米茎基腐病菌均具有较好的抑制效果[16]。针对平沙绿僵菌 *Metarhizium pingshaense* 对植物病原菌的拮抗研究未见报道。

作者对分离自黑龙江省的一株绿僵菌菌株 FZZ 进行了形态学和分子生物学鉴定,并对其生物学特性、致病性及拮抗作用进行研究,评价其生防潜力,研究结果对拓宽黑龙江省虫生真菌资源多样性,筛选高效、广谱绿僵菌及扩大绿僵菌生防范围具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫生真菌:菌株 FZZ,通过大蜡螟土壤诱集筛选获得[17]。

供试寄主昆虫:采用室内人工饲料连续饲养多代的小菜蛾 *Plutella xylostella* 2龄幼虫,由黑龙江省农业科学院植物保护研究所昆虫室提供。

供试植物病原菌:大豆根腐病菌尖镰孢 *Fusarium oxysporum*、水稻稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae*、水稻纹枯病菌 *Rhizoctonia solani*、玉米大斑病菌 *Setosphaeria turcica*、玉米茎基腐病菌 *Fusarium graminearum*、番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea*、马铃薯早疫病菌 *Alternaria solani*,以上病原菌菌株由黑龙江省农业科学院植物保护研究所免疫室提供。

1.2 菌株的分离纯化及鉴定

1.2.1 菌株分离纯化

采集黑龙江地区不同类型土壤样品,其中森林土壤采集地表以下 20 cm 土样,其他类型土壤采集地表以下 10 cm 土样,实验室内 4℃保存备用。采用大蜡螟诱集法对供试土样进行虫生真菌的诱集[17],收集僵虫,从感染的僵虫中分离纯化虫生真菌。

1.2.2 菌落形态观察

选取一株待鉴定的菌株 FZZ,刮取其分生孢子,用无菌水配制成孢子悬浮液。取 0.4 mL 孢子悬浮液均匀涂布于 90 mm 直径的 PDA 平板上,培养 3 d 后,用直径 7 mm 的打孔器在培养皿边缘打取菌碟,将菌碟转接于 PDA 平板中央,置于 25℃培养箱黑暗培养,每隔 2 d 观察菌落形态,至 15 d 结束。

1.2.3 菌株分子鉴定

FZZ 菌株在 PDA 培养基上培养 7 d,收集菌体,依据康维试剂真菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取菌体 DNA。采用真菌核糖体 rDNA 通用引物 ITS1(TCCGTAGGTGAACCTGCGG)和 ITS4(TCCTCCGCTTATTGATATGC)[18]扩增 ITS1-5.8S-ITS2 rDNA 全序列及部分 18S 和 28S rDNA 序列。引物由华大基因公司合成。

PCR 扩增体系 50 μL:2×PCR Mix 1 μL,10 μmol/L 通用引物各 2 μL,模板 DNA 1 μL,ddH_2O 补足至 50 μL。反应条件:94℃ 4 min;94℃ 1 min,55℃ 40 s,72℃ 90 s,共 35 个循环;72℃ 10 min。扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分离,目的片段经 DNA 回收试剂盒回收纯化后,PCR 回收产物直接送样测序。将测序后获得的序列提交到 NCBI,用 BLAST 完成序列分析,并构建系统发育树。

1.3 菌株生物学特性研究

1.3.1 菌株生长和产孢量

制取菌株 FZZ 菌碟过程同 1.2.2,将菌碟接种到 PDA 平板中央后,分别置于 12、14、15、20、25、28、30、35、37、40℃培养箱中黑暗培养,每处理重复 5 皿。每隔 2 d 用直尺采用十字交叉法测量菌落直径,至 14 d 结束测量,并在 14 d 收集每皿分生孢子,

用吐温 80 配成孢子悬浮液,测定菌株产孢量。

1.3.2 菌株的孢子萌发和芽管生长

刮取培养 14 d 的 FZZ 菌株分生孢子置于 1% 无菌葡萄糖营养液中,振荡分散均匀,利用血球计数板,采用稀释法调整孢子悬浮液浓度,使其在显微镜 400 倍下每个视野 50～100 个孢子。

孢子萌发试验采用载玻片悬滴法:载玻片上滴一滴配好的孢子悬浮液,将载玻片放在保湿的培养皿(RH=100%)内,培养皿用保鲜膜封口再加盖培养皿盖,置于 25℃培养箱黑暗培养,48 h 检测孢子萌发率,以芽管长度超过孢子一半长度为标准,判定孢子萌发。

1.4 菌株对小菜蛾致病性研究

用 0.05%无菌吐温 80 收集 FZZ 菌株分生孢子,振荡均匀后,血球计数板计数,调整孢子悬浮液浓度,配成 1.0×10^9 个/mL 孢子悬浮液后,采用十倍稀释法,依次获得 1.0×10^8、1.0×10^7、1.0×10^6、1.0×10^5 个/mL 孢子悬浮液。将小菜蛾 2 龄幼虫分别在不同浓度孢子悬浮液中浸 10 s,取出的虫体放在无菌滤纸上,待虫体体表无明显水滴,将幼虫放入装有湿润滤纸的饲养盒内,每天饲喂新鲜油菜叶。油菜叶柄处裹棉花保湿。饲养盒放置在 25℃、L//D=14 h//10 h 恒温培养箱中。每处理 20 头试虫,重复 3 次,以 0.05%的吐温 80 处理为对照,每天定时观察并记录小菜蛾幼虫的死亡情况。将死亡的幼虫挑至装有保湿滤纸的培养皿内,放置在 25℃恒温培养箱中,每天记录被侵染虫数,至第 7 天结束。

1.5 菌株对植物病原菌拮抗作用研究

1.5.1 菌株对植物病原真菌菌丝生长的抑制作用

用无菌水收集 FZZ 菌株分生孢子,制成孢子悬浮液,取 400 μL 孢子悬浮液涂布于萨氏培养基(SDAY)平板,用直径 5 mm 的打孔器将活化后的植物病原菌打成菌碟,接种到 PDA 培养基平板中央,均置于 25℃培养箱黑暗培养 3 d,待用。

采用双重对峙培养法。用直径 5 mm 的打孔器分别在植物病原菌边缘、FZZ 菌株平板上打取菌碟,在 PPDA 培养基平板圆周上,距培养皿边缘 1 cm 处,对向接种病原菌和 FZZ 菌株菌碟各一块,重复 4 次。设只接种病原菌的平板为对照。置 25℃黑暗培养,待对照植物病原菌长满平皿,直尺测量抑菌带宽和处理组病原菌菌落半径,计算菌丝生长抑制率(IMG)。

IMG=(对照菌落半径－病原菌菌落半径)/对照菌落半径×100%。

1.5.2 菌株代谢产物对植物病原菌的抑菌活性

将 FZZ 菌株从斜面转接到 SDAY 培养基上,25℃培养 5 d,用直径 5 mm 打孔器在菌落边缘打取菌碟,接种到 100 mL 萨氏液体培养基中,每三角瓶 3 个菌碟,于 25℃、180 r/min 条件下振荡培养 5 d。将发酵液在 4℃、10 000 r/min 条件下离心 15 min,收集上清液,上清液用 0.22 μm 细菌过滤器过滤,获得无菌发酵滤液,置 4℃ 冰箱中保存备用。

采用平板扩散培养法。在 PPDA 培养基平板中央接种植物病原菌菌碟,在菌碟周围,用直径 12 mm 打孔器按等边三角形等距离打 3 个孔,每孔接入 FZZ 菌株发酵滤液 400 μL,每处理重复 5 次。以每孔接入无菌萨氏培养液为对照。置 25℃培养箱黑暗培养,待对照菌落长满培养皿,测量抑菌圈直径。

1.6 统计分析

生物学特性及对病原菌菌丝的抑制作用研究数据采用 SPSS 13.0 数据处理系统进行方差分析和 Duncan 氏多重比较,毒力测定采用 POLO 数据处理系统算出毒力回归方程及 LC_{50}、LT_{50}。

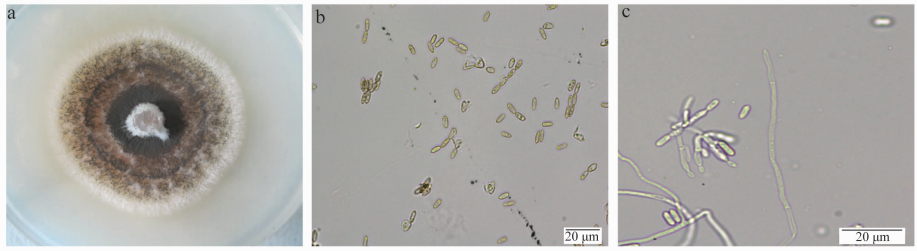
2 结果与分析

2.1 菌株的菌落形态观察

在 PDA 培养基上,FZZ 菌株生长初期菌丝白色,随菌丝生长,形成同心环状菌落,在菌落中央先产生橄榄绿色分生孢子,培养至后期整个菌落被橄榄绿色分生孢子覆盖,在成熟的分生孢子堆中夹杂着白色次生菌丝。在奥林巴斯光学显微镜下观察,菌丝分支、有隔、无色光滑,分生孢子梗与菌丝近似,在其末端产生瓶状单个或多个小梗,小梗密生整齐,从末端形成长串链状分生孢子。分生孢子长椭圆形,两端钝圆、较对称。分生孢子团牢固、排列整齐。分生孢子大小为(2.03～2.66)μm×(6.40～7.13)μm,(图 1)。该菌株形态描述与郭好礼等和张亚波等描述的平沙绿僵菌基本一致[19-20],因此可以初步鉴定为平沙绿僵菌。

2.2 菌株的分子生物学鉴定

利用通用引物对供试 FZZ 菌株的 ITSI-5.8S-ITS2 rDNA 全序列及部分 18S rDNA 和 28S rDNA 序列进行扩增,获得一条大小 500 bp 左右的片段(GenBank 登录号 KY419576)。通过 BLAST 进行序列比对,与平沙绿僵菌(JF827149)相似性最高,为 99%。在 GenBank 中筛选绿僵菌属部分种序列,结合本试验菌株 FZZ 序列,构建系统发育进化树(图 2)。经菌落形态和分子鉴定,FZZ 菌株为平沙绿僵菌 *Metarhizium pingshaense*。



a: FZZ菌落形态; b: 分生孢子; c: 产孢细胞
a: Colony of strain FZZ; b: Conidia; c: Conidiogenous cell

图 1 绿僵菌 FZZ 菌株形态特征

Fig. 1 Morphological feature of colony and conidia of strain FZZ

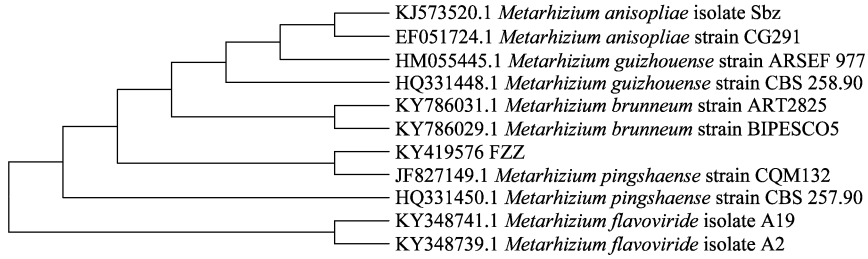


图 2 基于 rDNA-ITS 序列构建的绿僵菌菌株发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of different *Metarhizium* strains based on rDNA-ITS sequences

2.3 菌株生长与孢子产量

在设定的 10 组温度条件下，除 40℃下菌株不生长外，其余温度下均可生长，但生长速率和产孢量存在明显差异。28℃下，菌株的生长速率极显著高于其他温度处理。进一步从形态学观察，25℃下菌丝致密度比 28℃高。20℃和 25℃下，菌株的产孢量无显著差异，且极显著高于其他温度条件下孢子产量(表 1)。结果表明，FZZ 菌株生长的最适温度为 25℃，最适产孢温度范围为 20～25℃。

表 1 不同温度下菌株 FZZ 生长速率及产孢量[1)]

Table 1 Growth rate and conidia production of strain FZZ at different temperatures

温度/℃ Temperature	生长速率/cm·d^{-1} Growth rate	产孢量/×10^{6}个·皿$^{-1}$ Conidia production
12	(0.03±0.007)iH	0 cC
14	(0.06±0.011)hG	(43.33±26.01)cC
15	(0.09±0.000)gF	(195.58±48.56)cC
20	(0.21±0.005)eE	(1 795.83±519.47)aA
25	(0.32±0.215)bB	(2 104.17±811.08)aA
28	(0.37±0.011)aA	(1 070.83±517.55)bB
30	(0.27±0.017)cC	(592.08±272.81)bcBC
35	(0.19±0.115)fE	(3.00±2.27)cC
37	(0.23±0.000)dD	(42.63±5.34)cC
40	0 jI	0 cC

1) 同列数据不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著；同列数据不同大写字母表示在 0.01 水平差异极显著，下同。
The different lowercase letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level; The different capital letters in the same column indicate extremely significant difference at 0.01 level. The same below.

2.4 孢子的萌发与芽管的形成

试验结果表明(表 2)，在 15℃下培养 48 h，孢子不萌发。在其他设定的孢子培养温度下，孢子的萌发率无显著差异。30℃下孢子的萌发率最高，达 48%，且多芽管萌发占总萌发数的比例最高，为 32%。25℃下芽管最长，达 19.29 μm。

表 2 不同温度下 FZZ 菌株 48 h 萌发率及芽管长

Table 2 Conidia germination rate and length of germ tube of strain FZZ at different temperatures for 48 h

温度/℃ Temperature	萌发率/% Germination rate	多芽管萌发比例/% Germination ratio of multi germ tube	芽管长/μm Length of germ tube
15	0 cB	0 cC	0 bB
20	(34±7)bA	(15±8)bABC	(11.28±6.31)abAB
25	(43±11)abA	(26±12)abAB	(19.29±12.90)aA
30	(48±14)aA	(32±17)aA	(16.78±10.46)aA
35	(39±5)abA	(13±8)bBC	(17.49±11.06)aA

2.5 对小菜蛾幼虫的侵染致病性

FZZ 菌株孢子液处理小菜蛾 2 龄幼虫初期，幼虫的触碰反应、取食行为及外表与对照组无差异。接种第 2 天后，陆续出现侵染致病死亡的幼虫，死虫体色发生变化，多数变灰褐色或黑色。被侵染致病的幼虫 25℃保湿培养后，虫尸体表长出白色菌丝，至被橄榄绿色分生孢子覆盖。侵染致病率与处理浓度显著相关，孢子浓度 1.0×10^9 个/mL 的高浓度处理第 2 天和第 5 天，对小菜蛾 2 龄幼虫校正累计侵染率最

高,分别为 63.33%和 78.33%(表 3)。通过分别建立的 FZZ 菌株的孢子浓度与小菜蛾幼虫校正累计侵染率、处理时间和校正累计侵染率的毒力回归方程分析表明,菌株 FZZ 对小菜蛾 2 龄幼虫的 LC_{50} 为 1.29×10^8 个/mL(95%置信区间 $5.94\times10^7\sim5.11\times10^8$ 个/mL,毒力回归方程 $Y=-5.58+0.69X$),LT_{50} 为 4.48 d(95%置信区间 3.67～7.22 d,回归方程 $Y=-1.26+1.94X$)。

表 3　菌株对小菜蛾 2 龄幼虫的毒力测定

Table 3　Virulence of the FZZ strain on 2nd instar larvae of *Plutella xylostella*

孢子悬浮液浓度/个·mL^{-1} Concentration	校正累计侵染率/% Corrected accumulative infection rate			
	2 d	3 d	4 d	5 d
1.0×10^5	(12.25±7.51)bB	(12.25±7.51)cdB	(12.25±7.51)cC	(17.84±11.15)cC
1.0×10^6	(5.18±5.27)bB	(10.26±5.40)dB	(15.26±5.02)cC	(18.68±7.78)cC
1.0×10^7	(25.00±13.23)bB	(30.00±13.23)bcB	(38.33±10.41)bB	(41.67±7.64)bBC
1.0×10^8	(25.00±13.23)bB	(35.00±13.23)bB	(50.00±8.66)bB	(51.67±7.64)bB
1.0×10^9	(63.33±10.41)aA	(68.33±7.64)aA	(76.67±7.64)aA	(78.33±10.41)aA

2.6　菌株对植物病原真菌菌丝生长的抑制作用

平沙绿僵菌对 7 株植物病原菌的菌丝生长均表现出不同程度的抑制作用。对水稻稻瘟病菌菌丝生长抑制率最高,达 45.45%,对大豆根腐病菌的抑制率最低,为 36.31%,对马铃薯早疫病菌的抑菌带宽最大,达 0.87 cm;对大豆根腐病菌的抑菌带宽最小,仅有 0.28 cm(表 4)。

表 4　菌株 FZZ 对植物病原菌的抑制作用

Table 4　Inhibition activity of the strain FZZ to plant pathogenic fungi

植物病原菌 Plant pathogenic fungi	菌丝生长抑制率/% Inhibition rate	抑菌带宽/cm Length of inhibition zone
大豆根腐病菌尖镰孢 *Fusarium oxysporum*	(36.31±1.91)aA	(0.28±0.10)cD
水稻稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae*	(45.45±1.93)aA	(0.56±0.08)bBC
玉米大斑病菌 *Setosphaeria turcica*	(37.30±9.52)aA	(0.79±0.05)aAB
番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea*	(39.10±18.80)aA	(0.45±0.21)bcCD
马铃薯早疫病菌 *Alternaria solani*	(37.58±3.03)aA	(0.87±0.24)aA
水稻纹枯病菌 *Rhizoctonia solani*	(39.33±1.94)aA	(0.57±0.08)bBC
玉米茎基腐病菌 *Fusarium graminearum*	(37.13±1.62)aA	(0.56±0.06)bBC



马铃薯早疫病菌+绿僵菌FZZ *A. solani*+strain FZZ　　马铃薯早疫病菌 *A. solani* 对照 Control　　大豆根腐病菌尖镰孢+绿僵菌FZZ *F. oxysporum*+strain FZZ　　大豆根腐病菌尖镰孢 *F. oxysporum* 对照 Control

图 3　菌株 FZZ 对几种植物病原菌菌丝生长的抑制作用

Fig. 3　Inhibition activity of strain FZZ to plant pathogenic fungi

2.7　菌株代谢产物的抑菌作用

菌株 FZZ 发酵滤液仅对番茄灰霉病菌有抑制作用(图 4),抑菌圈直径(2.93±0.15)cm,对其余 6 株病原菌没有抑制效果。

3　讨论

由于同一菌株在不同培养条件下及在同一培养条件下都有可能发生变化,且分生孢子大小存在重叠,因此不能完全依靠形态学特征作为分类的标准[21]。本研究对大蜡螟诱集法得到的菌株 FZZ 进行了形态学及 ITS 序列分析,鉴定出其为平沙绿僵菌,并对其进行了生物学特性、致病力及对常见致病菌拮抗作用的测定。



图 4 菌株 FZZ 发酵滤液对番茄灰霉病菌菌丝生长的抑制作用

Fig. 4 Inhibition activity of fermented filtrate of strain FZZ to *Botrytis cinerea*

生物学特性研究是菌株研究的基础。王宝辉等对绿僵菌 MS01 菌株的研究发现，该菌株在 26℃下营养生长最好，28℃下产孢量最高，孢子萌发速度最快，萌发率最高[22]。张亚波等对平沙绿僵菌 WP08 的研究表明，在 25℃和 30℃下 12 h 该菌株孢子萌发率均在 96%以上；且具有较宽的温度生长范围，在 30℃下生长速度最快，其次为 25℃；25℃下产孢量极显著高于其他温度处理[20]。本研究中平沙绿僵菌生物学特性与张亚波等研究略有差异，分析原因，首先分离自不同区域的绿僵菌菌株在不同培养基、不同处理下的生物学特性存在较大差异；其次孢子萌发率试验中收集孢子的液体不同，也有可能导致孢子萌发率有差异。

致病力始终是衡量虫生真菌生防潜力的重要指标。在对虫生真菌进行毒力测定时，供试昆虫的龄期、接种方式、外界条件等都会影响其结果[23]。雷妍圆等比较了 4 种接种方式下球孢白僵菌 Bb02 对小菜蛾 2 龄和 3 龄幼虫的致病力，认为浸虫法最适于室内准确评价球孢白僵菌对小菜蛾的致病力[24]。张建伟、王中康等采用金龟子绿僵菌对小菜蛾 3 龄幼虫进行毒力测定，25℃下 5.0×10^7 个/mL 菌液的 LT_{50} 为 2.44 d；第 7 天的 LC_{50} 为 2.31×10^4 个/mL[25]。本研究中平沙绿僵菌的孢子萌发率较低，有可能是导致其 LC_{50} 较高的原因。进一步的研究中要考虑提高分生孢子萌发率。

绿僵菌对植物病原菌的拮抗作用报道较少，现有报道以金龟子绿僵菌为主。齐永霞等研究的金龟子绿僵菌 Ma55 菌株 3.25×10^6 cfu/mL 对 3 株枯萎病菌菌丝生长抑制率均超过了 70%，培养 20 d 的无菌发酵液对 3 株枯萎病菌菌丝生长抑制率最高也达到了 59.86%；Ma55 菌株随孢子悬浮液浓度降低对小麦纹枯病菌的抑制作用也相应减弱，培养 5 d 的发酵液对小麦纹枯病菌菌丝生长抑制率达 65.92%，其拮抗机制为营养竞争、空间竞争及抗生作用[14-15]。本文首次以平沙绿僵菌菌株为研究对象，发现了该菌株对 7 株植物病原菌均有不同程度的抑制作用，都可以产生抑菌带。菌株代谢产物仅对番茄灰霉病菌有较强的抑菌活性。研究发现，菌株是通过竞争和抗生作用对植物病原菌产生抑制作用的，未发现重寄生作用。本研究通过对平沙绿僵菌 FZZ 菌株的研究，对其生物学特性、致病力及拮抗作用方面有了一定了解，这对筛选高效、广谱平沙绿僵菌及扩大平沙绿僵菌生防范围具有重要意义。

参考文献

[1] 蒲蛰龙，李增智. 昆虫真菌学[M]. 合肥：安徽科学技术出版社，1996.

[2] CHANDLER D, DAVIDSON G, PELL J K, et al. Fungal biocontrol of acari [J]. Biocontrol Science Technology, 2000, 10(4): 357-384.

[3] 孙晓东，李富恒，阎伟，等. 椰子织蛾高毒力金龟子绿僵菌菌株的筛选[J]. 植物保护，2016，42(6)：215-218.

[4] AMERASAN D, NATARAJ T, MURUGAN K, et al. Mycosynthesis of silver nanoparticles using *Metarhizium anisopliae* against the rural malaria vector *Anopheles culicifacies* Giles (Diptera: Culicidae)[J]. Journal of Pest Science, 2015, 6(11): 1-8.

[5] 马丽娟，滕忠才，臧欢，等. 对斜纹夜蛾高效绿僵菌的筛选[J]. 植物保护，2012，38(5)：78-83.

[6] 赵俊生，贺沛芳，郭素萍，等. 应用绿僵菌防治鳞翅目蔬菜害虫及壮苗试验[J]. 植物保护，2001，27(5)：29-30.

[7] UJJAN A A, KHANZADA M A, MAHAR A Q, et al. Efficiency of *Metarhizium* spp. (Sorokin) strains and insecticides against cotton mealybug *Phenacoccus solenopsis* (Tinsley)[J]. Pakistan Journal of Zoology, 2015, 46(6): 100-105.

[8] IMOULAN A, ALAOUI A, MEZIANE A E. Natural occurrence of soil-borne entomopathogenic fungi in the Moroccan Endemic forest of *Argania spinosa* and their pathogenicity to *Ceratitis capitata* [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2011, 27(11): 2619-2628.

[9] BIDOCHKA M J, KASPERSKI J E, WILD G A M. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats [J]. Canadian Journal of Botany, 1998, 76: 1198-1204.

[10] VEGA F E, GOETTEL M S, BLACKWELL M, et al. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology[J]. Fungal Ecology, 2009, 2(4): 149-159.

[11] 李增智，黄勃，陈名君，等. 分子时代的白僵菌研究[J]. 菌物学

报，2011，30(6)：823－835.
[12] JABER L R，OWNLEY B H. Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? [J]. Biocontrol Control，2018，116：36－45.
[13] 农向群，张泽华. 昆虫病原真菌的生态适应性及其生物防治应用策略[J]. 中国生物防治学报，2013，29(1)：133－141.
[14] 齐永霞，陈方新，李增智. 金龟子绿僵菌对棉花枯萎病菌的拮抗作用研究[J]. 棉花学报，2010，22(6)：591－596.
[15] 齐永霞，陈方新，李增智. 绿僵菌对小麦纹枯病菌的抑制作用研究[J]. 激光生物学报，2011，20(6)：758－764.
[16] 陈方新，齐永霞. 虫生真菌对玉米茎基腐病菌的室内抑制作用研究[M]//郭泽建，吴元华. 中国植物病理学会 2014 年学术年会论文集. 北京：中国农业科学技术出版社，2014：530－534.
[17] 王爽，李新民，刘春来，等. 东北地区土壤中高毒力虫生真菌菌株的筛选[J]. 黑龙江农业科学，2015(1)：50－56.
[18] 宋晓兵，彭埃天，程保平，等. 一株侵染柑橘木虱的球孢白僵菌的分离及鉴定[J]. 植物保护，2017，43(4)：139－144.
[19] 郭好礼，叶柏龄，岳莹玉，等. 绿僵菌属的三个新种[J]. 真菌学报，1986，5(3)：177－184.
[20] 张亚波，吴盼盼，王鹏，等. 一株绿僵菌的鉴定及其生物学特性[J]. 林业科学，2012，48(12)：134－140.
[21] 王萌，殷幼平，王中康，等. 10 株绿僵菌菌株分类地位的多基因系统进化分析[J]. 植物保护，2014，40(5)：14－21.
[22] 王宝辉，郑建伟，黄大庄，等. 绿僵菌 MS01 菌株的生物学特性及在不同温湿度下对光肩星天牛幼虫的致病力[J]. 林业科学，2009，45(9)：158－162.
[23] SARFRAZ M，KEDDIE A B，DOSDALL L M. Biological control of the diamondback moth，*Plutella xylostella*：A review [J]. Biocontrol Science and Technology，2005，15(8)：763－789.
[24] 雷妍圆，吕利华，何余容. 不同接种方式下球孢白僵菌对小菜蛾的致病力[J]. 植物保护，2010，36(6)：142－146.
[25] 张建伟，王中康，申剑飞，等. 小菜蛾高致病力绿僵菌的筛选、鉴定及培养特性研究[J]. 中国生物防治学报，2012，28(1)：53－61.

（责任编辑：杨明丽）

征订启事

欢迎订阅 2019 年《中国生态农业学报》

《中国生态农业学报》由中国科学院遗传与发育生物学研究所和中国生态经济学会主办，中国科学院主管，科学出版社出版。系中国期刊方阵双效期刊、中国科技精品期刊、百种中国杰出学术期刊、中文核心期刊、RCCSE 中国权威学术期刊，为中国学术期刊综合评价数据库、中国期刊全文数据库、中国学术期刊文摘、中国科学引文数据库、中国科技论文与引文数据库、CNKI 中国期刊全文数据库源刊，并被国际农业生物学文摘(CABI)、美国化学文摘(CA)、哥白尼索引(IC)、美国乌利希国际期刊指南等国际数据库及检索单位收录。荣获第三届、四届全国农业优秀期刊一等奖和首届北方优秀期刊奖，中国北方优秀期刊，连续多届获得河北省优秀期刊奖。

《中国生态农业学报》主要报道全球环境变化与农业、农业生态系统与生态农业理论基础、农田生态系统与农业资源、生态农业模式和技术体系、农业生态经济学、农业环境质量及环境保护、农业有害生物的综合防治等领域创新性研究成果。适于从事农业生态学、生态学、生态经济学以及环境保护等领域科技人员、高等院校有关专业师生，农业及环境管理工作者和基层从事生态农业建设的技术人员阅读与投稿。

据《中国科技期刊引证报告》(核心版)2017 年影响因子为 1.462，学科排名第 3。据 CNKI《中国学学术期刊影响因子年报(自然科学与工程技术)·2017 版》期刊复合影响因子为 2.457，期刊综合影响因子为 1.617。

《中国生态农业学报》国内外公开发行，国内刊号 CN13－1315/S，国际刊号 ISSN1671－3990。月刊，国际标准大 16 开本，160 页，每期定价 35 元，全年 420 元。邮发代号：82－973，全国各地邮局均可订阅。漏订者可直接汇款至编辑部补订(需另加邮资 50.00 元/年)。

地　　址：(050022) 河北省石家庄市槐中路 286 号中科院遗传发育所农业资源研究中心《中国生态农业学报》编辑部

电　　话：(0311) 85818007

传　　真：(0311) 85815093

网　　址：http://www.ecoagri.ac.cn

E-mail：editor@sjziam.ac.cn

公众微信号：zgstnyxb