

草地贪夜蛾莱氏绿僵菌的分离鉴定

郑亚强^{1#}, 胡惠芬^{1,2#}, 付玉飞¹, 金新华¹, 张 栩¹, 杨宝云¹,
张志红¹, 黄明亮¹, 李永川², 陈 斌^{1*}, 李正跃^{1*}

(1. 云南农业大学植物保护学院, 云南生物资源保护与利用国家重点实验室, 昆明 650201;

2. 云南省植保植检站, 昆明 650034)

摘要 草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) 是 2019 年入侵我国的一种迁飞性害虫, 已成为严重影响我国玉米生产的重要害虫。目前国内关于草地贪夜蛾昆虫病原真菌的研究报道很少。2019 年 6 月, 在云南省曲靖市沾益县安东村玉米田调查发现了被虫生真菌感染的草地贪夜蛾幼虫。经室内分离培养, 结合形态和 ITS 序列相似性分析鉴定确认, 感染草地贪夜蛾幼虫病原性真菌为莱氏绿僵菌 *Metarhizium rileyi*, 编号为 ZYSP190701 菌株。调查表明, 2019 年 7 月 17 日田间草地贪夜蛾的莱氏绿僵菌感染率为 $15.46\% \pm 2.52\%$, 8 月 2 日感染率达 $29.83\% \pm 13.71\%$ 。用莱氏绿僵菌 ZYSP190701 菌株 1×10^8 个/mL 孢子浓度接种草地贪夜蛾 3 龄幼虫后第 7 天时草地贪夜蛾的感染死亡率高达 100%。上述结果表明, 莱氏绿僵菌 ZYSP190701 对草地贪夜蛾有良好的生防潜力, 具有草地贪夜蛾生防菌剂开发应用的前景。

关键词 草地贪夜蛾; 莱氏绿僵菌; 昆虫病原真菌; 生防菌剂

中图分类号: S 435.132 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2019399

Isolation and identification of entomopathogenic fungi *Metarhizium rileyi* isolated from *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)

ZHENG Yaqiang¹, HU Huifen^{1,2}, FU Yufei¹, JIN Xinhua¹, ZHANG Xu¹, YANG Baoyun¹,
ZHANG Zhihong¹, HUANG Mingliang¹, LI Yongchuan², CHEN Bin¹, LI Zhengyue¹

(1. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan, Kunming 650201, China;

2. Yunnan Plant Protection and Plant Quarantine Station, Kunming 650034, China)

Abstract *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) is an outbreak invasive pest, especially for maize. To date, little information about entomopathogenic fungi of *Spodoptera frugiperda* is available in China. In this study, fungi infected *S. frugiperda* larvae were found in Andong village, Zhanyi county, Qujing city, Yunnan province. The fungi were isolated from the infected cadaver of *S. frugiperda*, and then the species was identified based on the morphological and molecular biology, the virulence of the fungi against the larvae of *S. frugiperda* was tested. Results showed that this strain was identified as *Metarhizium rileyi* (No. ZYSP190701). The infection rate of *S. frugiperda* was $15.46\% \pm 2.52\%$ on 17th, July and $29.83\% \pm 13.71\%$ on 2nd, August, respectively. The cumulative mortality of the 3rd instar larvae of *S. frugiperda* 7 d after immersion inoculation at 1×10^8 conidia/mL was 100%. Our results demonstrated that *M. rileyi* ZYSP190701 is a promising candidate for *S. frugiperda* biocontrol in field.

Key words *Spodoptera frugiperda*; *Metarhizium rileyi*; entomopathogenic fungi; biological agents

草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), 又名秋黏虫, 隶属于鳞翅目 Lepidoptera, 夜蛾科 Noctuidae, 是一种原产于美洲热带和亚热带地

区的杂食性害虫, 尤其对玉米的危害较为严重^[1-3]。自 2019 年 1 月在我国云南省普洱市江城县首次发现草地贪夜蛾入侵以来^[4], 该虫已蔓延至我国的 19

收稿日期: 2019-08-06

修订日期: 2019-08-11

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0200703); 云南省大学生创新训练计划项目(S201910676043)

* 通信作者 E-mail: chbins@163.com; kmlizhengyue@163.com

为并列第一作者

个省 1 000 余个县,严重为害我国的玉米等作物^[5]。目前对于该虫的防治主要采用化学防治方法,然而该虫对农药的抗性较强,加之农药残留对于人畜的安全隐患,使化学农药防治受到一定制约^[6-7]。自该虫迁入我国以来,在我国科技工作者积极探究下,已发现一些昆虫天敌对草地贪夜蛾具有较好的生物防控能力^[8-10]。然而,国内关于该虫的病原真菌还鲜有报道。

昆虫病原真菌(entomopathogenic fungi)是一类能感染昆虫并在其体表或体内增殖,使昆虫发病甚至死亡的真菌^[11]。因其对环境友好,对害虫具有持续的控制能力,不易产生抗药性,被认为是最有可能替代化学农药的下一代新型生物农药^[11]。目前,在农林业害虫生物防治中,运用较为广泛的有球孢白僵菌 *Beauveria bassiana*、绿僵菌 *Metarhizium* spp. 和玫烟色棒束孢 *Isaria fumosorosea*,全世界以这些真菌开发和注册的微生物杀虫剂有 170 多种^[11-14]。我国利用虫生真菌杀虫剂在防治林业害虫马尾松毛虫 *Dendrolimus punctatus* 和粮食作物害虫亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Guenée) 和蝗虫等方面取得了重要成效^[15]。国外一些研究表明,球孢白僵菌 *B. bassiana*,布氏白僵菌 *B. brongniartii*,金龟子绿僵菌 *M. anisopliae*,莱氏绿僵菌 *M. rileyi* 对草地贪夜蛾具有良好的生防潜能^[16-18]。而国内,除程东美等^[19]报道白僵菌对草地贪夜蛾具有良好的生防潜力外,尚未见其他相关研究报道。

莱氏绿僵菌 *M. rileyi* (Farl.) Kepler, S. A. Rehner & Humber, 原名莱氏野村菌 *Nomuraea rileyi* (Farl.) Samson^[20],隶属子囊菌门 Ascomycota,麦角菌科 Clavicipitaceae,是一种对鳞翅目幼虫极具生防潜能的虫生真菌,在适宜的环境条件下能引起害虫的病害流行,有效地防治害虫^[21-22]。研究表明,该菌对斜纹夜蛾 *S. litura*、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 和小菜蛾 *Plutella xylostella* 等多种害虫具有较好的侵染致病力^[23-25]。然而,国内尚未见莱氏绿僵菌感染草地贪夜蛾的报道。

本课题组在云南省曲靖市沾益县玉米种植区调查发现,田间有草地贪夜蛾幼虫被真菌感染,由此对病原菌进行了分离培养和种类鉴定,为明确该菌株的分类地位和生防潜能,初步测定了该菌株的侵染

致病性,拟为开发真菌杀虫剂绿色防控草地贪夜蛾提供备选菌株和一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 采集地点及调查方法

试验地点为云南省曲靖市沾益县安东村玉米种植区。于该玉米种植区选择 5 块玉米田,每块田 5 点取样,每点 20 株,逐一统计每株玉米上草地贪夜蛾的数量和罹病虫量,计算僵虫率。2019 年 6 月 28 日首次发现该地有罹病草地贪夜蛾虫体,分别于 2019 年 7 月 17 日和 8 月 2 日进行了系统调查。

1.2 菌株的分离培养

将采集到的罹病草地贪夜蛾虫体置于 5 mL 无菌 EP 管中带回实验室,采用划线法,在萨氏(SDAY)培养基^[26](葡萄糖 40 g,蛋白胨 10 g,酵母浸膏粉 10 g,琼脂 20 g, pH 自然)上,于(25±1)℃,L//D=16 h//8 h,相对湿度 80%的光照培养箱中培养。培养 7 d 后,将分生孢子转接到新的培养基上进行纯化。纯化的菌株采用 SDAY 斜面培养基保存于 4℃ 冰箱。经形态学初步鉴定,所有分离的菌株形态特征一致,将其视为同一种菌,并命名为 ZYSP190701。

1.3 菌株致病性测定

将分离获得的菌株 ZYSP190701 接种于 PDA 培养基,待其产生大量的分生孢子后(约 20 d),用无菌解剖刀刮取培养基表面的分生孢子置于 0.02% 无菌吐温-80(北京索来宝生物有限公司)中,配制成 1×10^8 个/mL 孢子悬浮液。挑选大小一致、健康的草地贪夜蛾 3 龄幼虫,采用浸渍法进行接种。将草地贪夜蛾幼虫置于孢子悬浮液中浸渍 5 s,取出后用灭菌滤纸吸干虫体表面多余水分。然后将其置于加有玉米叶的 12 孔细胞培养板中,于 25℃、L//D=16 h//8 h 光照培养箱中饲养。每天定时观察,并将死亡虫体在(25±1)℃、L//D=16 h//8 h 条件下保湿培养,根据虫体是否长出目的菌确定各虫的死亡原因。设置 3 个重复,每重复 20 头虫。

1.4 菌落形态观察

将分离并纯化的真菌分别接于 PDA(马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 18 g,自然 pH,蒸馏水 1 000 mL)和 SDAY 培养基上,置于(25±1)℃,L//

D=16 h//8 h 光照培养箱(恒立(中国)实验室设备科技有限公司,型号 RG-300)中培养,于 3、7 和 14 d 时,分别测定菌落直径并观察菌落形态特征。

1.5 基因组 DNA 提取及 rDNA-ITS 的 PCR 扩增

病原菌 DNA 的提取:参照陈吉良等^[27]的 Chelex-100 法进行。使用无菌解剖刀于固体培养基上挑起绿豆大小菌苔于 1.5 mL Eppendorf 管中,加入液氮稍加研磨。然后加入 0.5 mL 10%(m/V)的 Chelex-100 溶液,涡旋器上振荡 5 s,沸水浴 10 min,冷却至室温后,12 000 r/min 离心 15 min。取上清液备用。

rDNA-ITS 的 PCR 扩增:PCR 反应体系为 25 μ L,包括引物 ITS1 和 ITS4 各 1 μ L,PCR mix 12.5 μ L,基因组 DNA 2 μ L,ddH₂O 8.5 μ L。反应条件:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 1 min,57℃ 退火 2 min,72℃ 延伸 1 min,32 个循环;72℃ 延伸 5 min。1.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物送昆明硕擎生物科技有限公司测序。

1.6 系统发育分析

根据测序结果,将序列进行编辑,去除两端质量不好的碱基,将优化好的 ITS 序列提交到 NCBI 网站 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),运用 BLAST 程序进行比对。序列经 BLAST 后下载相似性大于 84% 的序列及其相关近缘属菌株的 ITS 序列,用 MEGA 6.06 进行序列处理,应用最大似然法(ML),运行 1 000 次 bootstrap 验证,构建系统发育树^[28]。

2 结果与分析

2.1 田间僵虫率及室内致病性

2019 年 6 月 28 日在云南省曲靖市沾益县安东村玉米种植区首次发现草地贪夜蛾的罹病虫体,2019 年 7 月 17 日和 8 月 2 日对草地贪夜蛾的僵虫率进行系统调查,结果表明,7 月 17 日时僵虫率较低,为 15.46%±2.52%。8 月 2 日僵虫率为 29.83%±13.71%(图 1)。在田间,被感染的草地贪夜蛾幼虫一般附着于玉米叶片上或玉米心叶中,罹病虫体前期僵硬,虫体发红,随后逐渐长出大量白色菌丝,后期罹病虫体表面产生大量绿色的孢子粉(图 2a~d);孢子经室内分离培养后采用浸渍法回接草地贪夜蛾健康幼虫,接菌后 3~7 d 草地贪夜蛾幼虫死亡,其感

染症状和形态特征与田间感染症状一致,说明该菌株为草地贪夜蛾的病原真菌。致病性初步测定结果表明,在 1×10⁸ 个/mL 孢子浓度下,接菌后第 7 天,草地贪夜蛾 3 龄幼虫的累积死亡率达 100%。

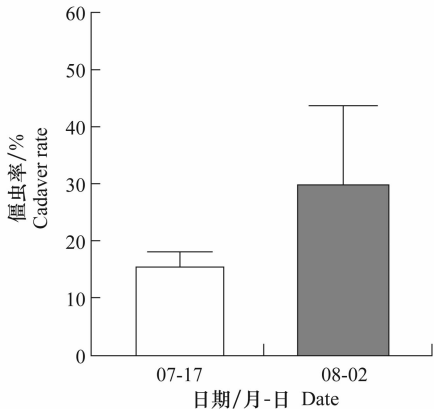


图 1 草地贪夜蛾幼虫田间僵虫率

Fig. 1 Field cadaver rate of *Spodoptera frugiperda* larva infected by *Metarhizium rileyi*

2.2 病原真菌的形态学特征

获得纯培养菌株后对其形态特征进行鉴定,结果(图 2)如下:分生孢子梗直立,着生于基质菌丝,具分隔。分生孢子梗长 130~140 μ m,粗 1.8~2.2 μ m,形成浓密的分支簇,其上着生 2~3 个瓶梗,表面光滑,圆柱形,一端较为膨大,一端尖细,大小为 (4.5~6) μ m×(2~3) μ m;分生孢子成链珠状,长椭圆形,表面光滑,大小为 (3~4) μ m×(2~3) μ m;该菌在 PDA 培养基上的生长速度相对较慢,25℃ 下生长 14 d,菌落直径 14.65~17.67 mm,菌落正面对白色,扁平,呈花瓣状,背面淡黄色,褶皱。该菌在 SDAY 培养基上的生长速度也相对较慢,25℃ 下生长 14 d,菌落直径 12.26~12.34 mm,菌落正面对白色,凸起,呈棉絮状,背面棕色,不规则。

2.3 病原真菌的分子鉴定结果

去除分离菌株 rDNA-ITS 序列两端质量不好的序列,将其与 NCBI 数据库进行 BLAST 比较,结果发现该菌株与 NCBI 数据库中的 *Metarhizium rileyi* strain CBS 424.51 菌株的相似性为 100%。系统发育(图 3)分析结果表明,该菌株与数据库其他莱氏绿僵菌株聚为一大支,说明该菌株与数据库中的莱氏绿僵菌株具有较高的相似性。综合形态特征鉴定和 ITS 序列相似性分析,将该菌株确定为莱氏绿僵菌。



a: 草地贪夜蛾幼虫田间感染症状; b: 室内回接分离菌株的草地贪夜蛾幼虫初期感染症状; c~d: 室内回接分离菌株的草地贪夜蛾幼虫后期感染症状; e~f: 分离菌株在PDA培养基上的正面和反面形态特征; g~h: 分离菌株在SDAY培养基上的正面和反面形态特征; i~k: 分离菌株的产孢结构; l: 分离菌株的分生孢子形态
a: Symptoms of diseased *S. frugiperda* larvae in field; b: The early symptoms of *S. frugiperda* larvae infected by *M. rileyi* ZYSP190701 in lab; c-d: The advanced symptoms of *S. frugiperda* larvae infected by *M. rileyi* ZYSP190701 in lab; e-f: Morphological characteristics of *M. rileyi* ZYSP190701 on PDA; g-h: Morphological characteristics of *M. rileyi* ZYSP190701 on SDAY; i-k: The sporogenous structure of *M. rileyi* ZYSP190701; l: The conidia morphology of *M. rileyi* ZYSP190701

图2 草地贪夜蛾的感染症状及莱氏绿僵菌菌落和分生孢子的形态特征

Fig. 2 Morphological characteristics of infected *Spodoptera frugiperda*, colony and conidia of *Metarhizium rileyi*

3 讨论

国外一些研究表明,莱氏绿僵菌对草地贪夜蛾的致死率可达 95%^[29]。本研究对云南省曲靖市沾益县草地贪夜蛾为害的玉米种植区调查发现,2019 年 7 月 17 日田间僵虫率较低,8 月 2 日僵虫率明显增加。由此表明随着时间的推移莱氏绿僵菌对草地贪夜蛾表现出明显的侵染作用。此外,室内初步毒力测定发现,1×10⁸ 个/mL 的孢子浓度下,草地贪夜蛾的死亡率可达 100%,相对于程东美等^[19]报道的白僵菌对草地贪夜蛾的致死率,本试验分离的莱氏绿僵菌对草地贪夜蛾的致病性更强。这些结果说明,云南省曲靖市沾益县气候环境适合莱氏绿僵菌在草地贪夜蛾种群中发生流行。该菌株对草地贪夜

蛾的侵染致病性较强,具有开发成绿色防控草地贪夜蛾生物菌剂的潜力。本研究对该地区由莱氏绿僵菌导致的草地贪夜蛾僵虫率仅调查了两次,还未明确其在不同季节的发生流行规律。因此,还需进一步深入研究该菌在不同季节的流行规律甚至不同环境下的发生流行情况,以为下一步开发真菌杀虫剂提供依据。

一些研究表明,莱氏绿僵菌相对于其他昆虫病原真菌,更易受到环境因素的影响^[17]。再加之真菌杀虫剂相对于化学农药见效慢,成本高,产孢困难^[11],也限制了该类菌剂的广泛应用。因此,如何解决上述问题,使该类生物防治菌剂得以更为广泛的运用值得进一步深入研究。一些研究表明,低毒、高效的化学农药与昆虫病原真菌(如球孢白僵菌,金

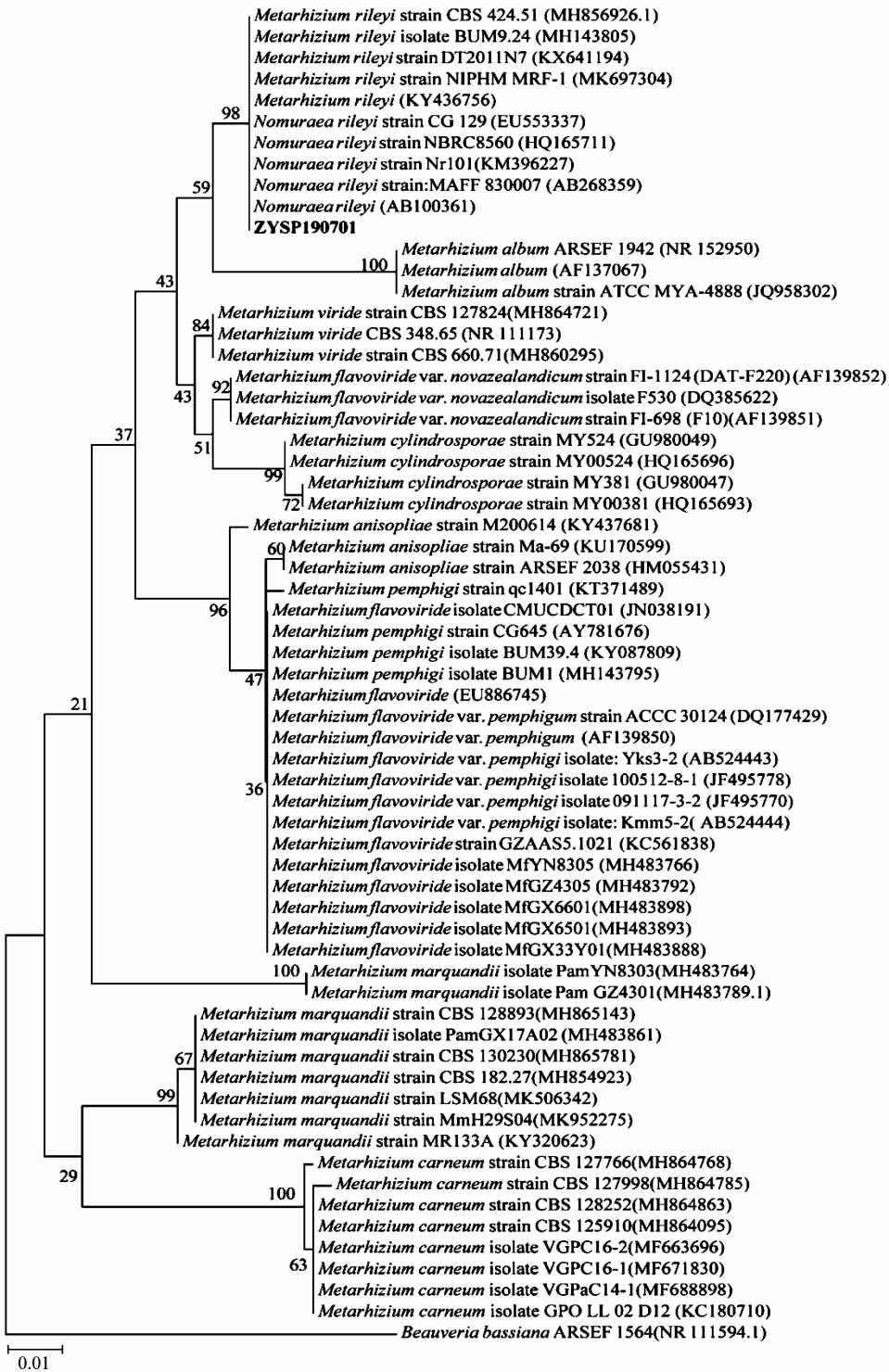


图 3 基于 ITS 序列 ZYSP190701 菌株的系统发育分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of ZYSP190701 strain based on ITS sequence

龟子绿僵菌)配合使用,能有效增强昆虫病原真菌对草地贪夜蛾的侵染致病性,并延缓化学农药对草地贪夜蛾的抗药性^[16]。因此,将本试验所分离的菌株与低毒高效化学农药混配也是下一步研究的方向。

参考文献

[1] LUGINBILL P. The fall armyworm[R]. New York: USDA Technology Bulletin,1928,34: 91.
[2] SPARKS A N. A review of the biology of the fall armyworm

- [J]. Florida Entomologist, 1979, 62(2): 82–87.
- [3] TODD E L, POOLE R W. Keys and illustrations for the armyworm moths of the noctuid genus *Spodoptera* Guenée from the Western Hemisphere [J]. Annals of the Entomological Society of America, 1980, 73(6): 722–738.
- [4] 杨学礼, 刘永昌, 罗茗钟, 等. 云南省江城首次发现迁入我国西南地区的草地贪夜蛾[J]. 云南农业, 2019(1): 72.
- [5] 卢辉, 唐继洪, 吕宝乾, 等. 草地贪夜蛾的生物防治及潜在入侵风险[J]. 热带作物学报, 2019, 40(6): 1237–1244.
- [6] BLANCO C A, PORTILLA M, JURAT-FUENTES J L, et al. Susceptibility of isofamilies of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1Ac and Cry1Fa proteins of *Bacillus thuringiensis* [J]. Southwest Entomology, 2010, 35(3): 409–415.
- [7] LEÓN-GARCÍA I, RODRÍGUEZ-LEYVA E, ORTEGA-ARENAS L D, et al. Susceptibilidad de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) an insecticidas asociada a césped en Quintana Roo, México [J]. Agrociencia, 2012, 46: 279–287.
- [8] 唐艺婷, 李玉艳, 刘晨曦, 等. 蠋蝽对草地贪夜蛾的捕食能力评价和捕食行为观察[J/OL]. 植物保护, 2019, 45(4): 65–68.
- [9] 唐艺婷, 王孟卿, 陈红印, 等. 益蝽对草地贪夜蛾捕食能力评价和捕食行为观察[J/OL]. 中国生物防治学报: 1–7 [2019–09–03]. <https://doi.org/10.16409/j.cnki.2095-039x.2019.04.005>.
- [10] 陈壮美, 赵琳超, 刘航, 等. 斯氏侧沟茧蜂对草地贪夜蛾幼虫的寄生行为及寄生效应[J]. 植物保护: 1–6 [2019–09–03]. <https://doi.org/10.16688/j.zwbh.2019341>.
- [11] SHAH P A, PELL J K. Entomopathogenic fungi as biological control agents [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 61(5/6): 413–423.
- [12] FENG Mingguang, POPRAWSKI T J, KHACHATOURIAN G G. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status [J]. Biocontrol Science and Technology, 1994, 4(1): 3–34.
- [13] FARIA M R D, WRAIGHT S P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types [J]. Biological Control, 2007, 43(3): 237–256.
- [14] SUJEETH J A R P, SAHAYARAJ K. Basic and applied aspects of biopesticides [M]. New Delhi: Springer, 2015: 31–46.
- [15] 李增智. 我国利用真菌防治害虫的历史、进展及现状[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(5): 699–711.
- [16] RIVERO-BORJA M, GUZMÁN-FRANCO A W, RODRÍGUEZ-LEYVA E, et al. Interaction of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* with chlorpyrifos ethyl and spinosad in *Spodoptera frugiperda* larvae [J]. Pest Management Science, 2018, 74 (9): 2047–2052.
- [17] GRIJALBA E P, ESPINEL C, CUARTAS P E, et al. *Metarhizium rileyi* biopesticide to control *Spodoptera frugiperda*: Stability and insecticidal activity under glasshouse conditions [J]. Fungal Biology, 2018, 122(11): 1069–1076.
- [18] AKUTSE K S, KIMEMIA J W, EKESI S, et al. Ovicidal effects of entomopathogenic fungal isolates on the invasive fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. Journal of Applied Entomology, 2019, 143(6): 624–634.
- [19] 程东美, 洪婉雯, 孙辉, 等. 草地贪夜蛾幼虫僵虫发生率调查及致病菌分离鉴定[J]. 环境昆虫学报: 1–9. (2019–07–18). <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1640.Q.20190717.1722.002.html>.
- [20] KEPLER R M, HUMBER R A, BISCHOFF J F, et al. Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics [J]. Mycologia, 2014, 106(4): 811–829.
- [21] 杜广祖, 郑亚强, 苏锦尧, 等. 云南莱氏野村菌田间自然发生流行动态研究[J]. 环境昆虫学报, 2018, 40(5): 160–168.
- [22] PERINOTTO W M S, TERRA A L M, ANGELO I C, et al. *Nomuraea rileyi* as biological control agents of *Rhipicephalus microplus* Tick [J]. Parasitology Research, 2012, 111(4): 1743–1748.
- [23] SRISUKCHAYAKUL P, WIWAT C, PANTUWATANA S. Studies on the pathogenesis of the local isolates of *Nomuraea rileyi* against *Spodoptera litura* [J]. Science Asia, 2005, 31(3): 273–276.
- [24] IGNOFFO C M, PUTTLER B, HOSTETTER D L, et al. Susceptibility of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* and the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*, to several isolates of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1976, 28(21): 259–262.
- [25] AMBETHGAR V. Potential of entomopathogenic fungi in insecticide resistance management (IRM): a review [J]. Journal of Biopesticides, 2009, 2(2): 177–193.
- [26] 蒲蛰龙, 李增智. 昆虫真菌学[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1996: 553–554.
- [27] 陈吉良, 黄小龙, 吴安迪, 等. 一种快速高效提取病原真菌 DNA 作为 PCR 模板的方法[J]. 菌物学报, 2011, 30(1): 147–149.
- [28] KUMAR S, TAMURA K, NEI M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5(2): 150–163.
- [29] BOSA C F, CHAVES D, TORRES L, et al. Evaluación de aislamientos nativos de *Nomuraea rileyi* para el control de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. Revista Colombiana de Entomología, 2004, 30(1): 93–97.

(责任编辑: 杨明丽)