

钟万芳,瞿钰峰,郭慧芳. 高效防治烟粉虱的玫烟色棒束孢 JZ-7 的特性[J]. 江苏农业科学,2013,41(7):104-105.

高效防治烟粉虱的玫烟色棒束孢 JZ-7 的特性

钟万芳,瞿钰峰,郭慧芳

(江苏省农业科学院植物保护研究所,江苏南京 210014)

摘要:为了寻求防治烟粉虱的有效措施,从自然罹病虫体上分离得到玫烟色棒束孢(*Isaria fumosorosea*),经室内毒力测定后,筛选出 1 株对烟粉虱具有较强致病力菌株 JZ-7,27 ℃ 时菌丝生长和产孢量达到最大。YPD 培养基上的菌丝生长最优,PDA、YM 培养基次之,YG 培养基最差;YPD 培养基的产孢量最多,YM、PDA 次之,YG 最少。

关键词:玫烟色棒束孢;烟粉虱;培养基;温度

中图分类号: S436.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)07-0104-02

烟粉虱 [*Bemisia tabaci* (Gennadius)] 属同翅目粉虱科,是一种繁殖力极强的世界性害虫。它对蔬菜等寄生作物的危害主要表现在 3 个方面:一是直接刺吸植物汁液,造成植株衰弱、干枯;二是若虫和成虫分泌蜜露,诱发煤污病;三是传播病毒病,后者所造成危害比前两者严重得多。有报道称,烟粉虱至少可在 30 多种作物上传播 70 多种病毒病^[1]。设施农业为烟粉虱提供了越冬场所和不间断食物源,大大加剧了该害虫发生危害。江苏省近年来随着高效农业的蓬勃发展,烟粉虱的发生危害也越来越重,一些大棚因烟粉虱危害造成番茄黄化曲叶病等病毒病的严重发生,甚至毁棚^[2]。烟粉虱的高效控制对于保障设施农业稳定发展至关重要。目前,对烟粉虱的防治主要仍以化学防治为主,由于化学农药的大量使用,加上不规范操作,烟粉虱产生了较强的抗药性^[3-5]。因此,在设施农业中研究控制烟粉虱的措施显得很迫切,无论是从以高效为目的的无公害要求出发,还是从避开烟粉虱本身对化学药剂的不易渗透以及广泛的抗药性来考虑^[6],都必须寻求更加持续有效安全环保的防治措施,以克服化学农药带来的负面效应。在烟粉虱的可持续控制中,生物防治占有重要地位。烟粉虱的天敌资源丰富,据报道,在世界范围内,寄生性天敌有 55 种,捕食性天敌 114 种,病原真菌 7 种。一些国家利用天敌控制烟粉虱已经取得了成功,如小黑瓢虫 (*Delphastus catalinae*) 在美国加州和佛罗里达等地已成功应用于控制棉花和圣诞红上的烟粉虱,并已被引入欧洲和我国福建;白僵菌 (*Beauveria* sp.) 和玫烟色棒束孢 [*Isaria fumosorosea*, 旧称玫烟色拟青霉 (*Paecilomyces fumosoroseus*)] 已作为控制烟粉虱的微生物杀虫剂^[7],但是我国却还鲜见此类报道^[8-11]。笔者在田间调查中发现并收集了侵染烟粉虱的玫烟色棒束孢,为了探明该拟青霉对烟粉虱的控制潜力,在筛选获得 1 株对烟粉虱有较强侵染力的玫烟色棒束孢 JZ-7 的基础上,进一步对

该菌株的生长及产孢量等应用生物学特性进行研究,以为产业化开发应用该菌株奠定基础。

1 材料与方法

1.1 培养基

PDA 培养基:马铃薯块 300 g/L、葡萄糖 20 g/L、琼脂 15 g/L。YPD 培养基:酵母提取物 10 g/L、蛋白胨 20 g/L、D-葡萄糖 20 g/L、琼脂 15 g/L。YM 培养基:酵母提取物 3 g/L、蛋白胨 5 g/L、D-葡萄糖 10 g/L、麦芽提取物 3 g/L、琼脂 15 g/L。YG 培养基:酵母提取物 2.5 g/L、D-葡萄糖 1 g/L、琼脂 15 g/L,pH 值 6.5。

1.2 防治烟粉虱的玫烟色棒束孢的分离纯化

将室内饲养于番茄上的未施用任何杀虫剂的烟粉虱罹病虫体置于 PDA 培养基上,于 27 ℃ 下培养 2~3 d,待长出菌落后,挑取菌落边缘菌丝培养,产孢后再经单孢分离纯化后保存备用。

1.3 玫烟色棒束孢的鉴定

用真菌 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。采用真菌核糖体 rDNA 区通用引物 ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) 和 ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC),扩增 ITS1-5.8S-ITS2 rDNA 全序列及部分 18S 和 28S rDNA 序列。25 μL PCR 反应体系:1 × PCR 缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl,500 mmol/L KCl,15 mmol/L MgCl₂,1% Triton-X),正反向引物各 1 μL,PCR 反应液 2 μL,0.2 mmol/L dNTP,0.5 U *Taq* DNA 聚合酶。PCR 反应程序为:94 ℃ 预变性 4 min;94 ℃ 变性 1 min,55 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 90 s,共 35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后进行测序,于显微镜下观察真菌菌丝及孢子形态。

1.4 不同培养基对平板培养菌丝生长与产孢量的影响

将 PDA、YG、YM、YPD 等 4 种培养基各 20 mL 分别倒入 90 mm 培养皿中,制成平板。在平板中央接种 1 μL 的 10⁶ 个/mL JZ-7 菌株孢子悬浮液,置于 27 ℃、相对湿度 80%、光照:黑暗=12 h:12 h 的人工气候箱中培养,测量培养后 4 d 的菌落直径和培养后 14 d 的产孢量。

1.5 不同温度对平板培养菌丝生长与产孢量的影响

在 YPD 平板中央接种 1 μL 浓度为 10⁶ 个/mL 的 JZ-7 菌株孢子悬浮液,置于 22、27、32、37 ℃ (湿度及光照条件同

收稿日期:2012-12-05

基金项目:江苏省科技支撑计划(编号:BE2010342);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(12)3059]。

作者简介:钟万芳(1978—),男,福建上杭人,博士研究生,副研究员,主要从事微生物农药研究。

通信作者:郭慧芳,博士,研究员,主要从事害虫生物防治研究。

E-mail:guohfjaas@163.com。

“1.4”节)下培养,测量培养后 4 d 的菌落直径和培养后 14 d 的产孢量。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果及序列分析

以提取的基因组 DNA 为模板,用通用引物 ITS1 和 ITS4 扩增 rDNA-ITS,电泳图谱显示片段大小约为 160 bp,测序结果显示包含引物在内的序列长度为 589 bp(图 1)。BLAST 同

源序列检索结果显示,在亲缘关系相近的序列中大多为拟青霉菌,其中有 15 种菌株与 JZ-7 具有 100% 的同源性,即 8 种玫烟色棒束孢菌株(GenBank 登录号为 AF461747、AF461748、FJ765007、FJ765008、FJ765009、FJ765012、FJ765013、FJ765015)、5 种爪哇棒束孢(*I. javanica*)菌株(AB263744、DQ403723、EF990131、JN204422、JN204422)及 2 种棒束孢(DQ403724、HM595502)。结合平板及显微镜观察鉴定,确定该菌株为玫烟色棒束孢。

```

1      TCOGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTAAACGAGTTTTTTC AACCTCCCTAACCCCTTTGT
61     GAACATACCTATCGTTGCTTGGGCGGACTGCGCCCGGCGTCCGAAGGCGCTGCGCCGCC
121    CGGGAACCGGAACCGAGGCGCGCGGAGACCCACAAATTCGTTCTATCAGTCTTTCT
181    GAATCGCGCAAGGCAAAACAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCT
241    GGCATCGATGAGAACGACGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATGACAGAATTCAGTGAA
301    TCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGCGCGCCAGCATTC TGCGGGCATGCTGTTOGA
361    GCGTCATTTCAACCCCTCGACACCCCTTCGGGGGAGTCGGCGTTGGGGAACGGCAGCATA
421    CGCGGCCCGGAAATACAGTGGCGGCGCGTCGCGGCGACCTCTGCGTAGTACTOCAACG
481    CGCACCGGGAACCGACGCGGCCACGCGGTAAACACCCAACTTTCGAAACGTTGACCTCG
541    GATCAGGTAGGACTACCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
  
```

图1 玫烟色棒束孢 JZ-7 的 rDNA-ITS 序列

2.2 不同培养基对平板培养菌丝生长与产孢量的影响

在 27 ℃、相对湿度 80%、光照:黑暗=12 h:12 h 的人工气候箱中培养 4 d,PDA、YG、YM、YPD 培养基上的菌落直径分别为 21.7、15.3、20.3、24.2 mm,有利于菌丝生长的培养基顺序为:YPD>PDA>YM>YG。14 d 后将培养基上的孢子刮下重悬于 5 mL 无菌水(含 0.05% Tween-80)中,稀释至一定浓度,用血球计数板进行计数。结果发现,在 PDA、YG、YM、YPD 培养基上产孢量分别为 4×10^{10} 、 2×10^8 、 6×10^{10} 、 2×10^{11} 个/mL,即在 YPD 培养基上产孢量最多,YM、PDA 培养基次之,YG 培养基最少。

2.3 不同温度对平板培养菌丝生长与产孢量的影响

比较 22、27、32、37 ℃条件下 JZ-7 在 YPD 培养基上的生长情况发现,培养后 4 d 菌落直径分别为 18.5、25.1、5.3、2.1 mm,说明在 22~27 ℃之间,菌落直径随着温度的升高而增加,但是温度超过 30 ℃后生长极为缓慢甚至不生长;培养后 14 d 的产孢量依次为 5×10^{10} 、 2×10^{11} 、 1×10^2 、0 个/mL。

3 结论

玫烟色棒束孢是一种地理分布广泛的丝状真菌,据不完全统计,超过 25 科的昆虫可被其感染,其中不少是重大的农作物害虫。由于寄主范围广,玫烟色棒束孢作为一个很有前途的生物防治剂,在国外已形成一些产品,如 Sepro 公司的 PreFeRal、Certis 公司的 PFR-97 等。国内对玫烟色棒束孢进行了一些研究,但是迄今为止还没有产品进入登记程序。笔者在筛选获得对烟粉虱高毒力的玫烟色棒束孢 JZ-7 基础上,对其培养条件等进行研究,为其产业化生产奠定基础。

不同培养条件对玫烟色棒束孢 JZ-7 生长和产孢量具有明显的影响,菌丝生长与产孢量以 27 ℃为宜,温度超过 30 ℃则会限制其生长及产孢,甚至不生长产孢。培养基营养成分研究结果表明,YPD 培养基最利于其菌丝生长及产孢,YG 培

养基则最不利于,说明一定范围内葡萄糖、蛋白胨含量越高越有利于菌株生长及产孢。

参考文献:

- [1] Berlinger M J, Dahan R. Breeding for resistance to virus transmission by whiteflies in tomatoes[J]. Science and Its Application, 1987, 8 (4/5/6): 783-784.
- [2] 龚伟荣,刁春友,杜予州,等. 江苏省烟粉虱发生规律与综合防治技术[J]. 江苏农业科学, 2006(6): 169-171.
- [3] Prabhaker N, Coudriet D L, Meyercliek D E. Insecticide resistance in the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) [J]. J Econ Entomol, 1985, 78(4): 748-752.
- [4] Prabhaker N, Coudriet D L, Toscano N C. Effect of synergists on organophosphate and permethrin resistance in sweetpotato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) [J]. J Econ Entomol, 1988, 81(1): 34-39.
- [5] Ditttrich V, Ernst G H, Ruesch O, et al. Resistance mechanisms in sweet potato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) populations from Sudan, Turkey, Guatemala, and Nicaragua [J]. J Econ Entomol, 1990, 83(5): 1665-1670.
- [6] Schuster D J, Mann R S, Toapant M, et al. Monitoring neonicotinoid resistance in biotype B of *Bemisia tabaci* in Florida [J]. Pest Manag Sci, 2010, 66(2): 186-195.
- [7] 张世泽, 万方浩, 花保桢, 等. 烟粉虱的生物防治[J]. 中国生物防治, 2004, 20(1): 57-60.
- [8] 黄振, 任顺祥, 吴建辉. 玫烟色拟青霉对烟粉虱种群的控制作用[J]. 华南农业大学学报, 2007, 28(2): 24-28.
- [9] 黄振, 任顺祥, 吴建辉, 等. 几种农药对玫烟色拟青霉致病力的影响[J]. 华南农业大学学报, 2008, 29(3): 16-20.
- [10] 景云飞, 张仙红. 昆虫病原真菌玫烟色拟青霉的研究进展[J]. 江西农业科学, 2007, 35(9): 19-22.
- [11] 孟瑞霞, 张青文, 刘小侠. 烟粉虱生物防治应用现状[J]. 中国生物防治, 2008, 24(1): 80-85.