

王铁军,钟万芳,朱丽梅,等. 烟粉虱病原真菌的分离鉴定及生物活性初步研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(11):148-150.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.11.044

# 烟粉虱病原真菌的分离鉴定及生物活性初步研究

王铁军<sup>2</sup>, 钟万芳<sup>3</sup>, 朱丽梅<sup>1</sup>, 王 耘<sup>1</sup>, 陈 冬<sup>4</sup>, 康秋玉<sup>4</sup>, 赵明珠<sup>4</sup>

(1. 金陵科技学院园艺学院, 江苏南京 210036; 2. 南京新农科创投资有限责任公司, 江苏南京 211134;  
3. 江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏南京 210014; 4. 南京清雅花卉专业合作社, 江苏南京 211134)

**摘要:**对田间分离的死亡烟粉虱虫体进行保湿培养,分离得到1株具有杀虫活性的菌株,通过对该菌株的形态、培养特征的观察及对其 ITS 核酸序列进行扩增与分析,鉴定该菌株为玫烟色棒束孢(*Isaria fumosorosea*)。采用浸渍法测定该菌株对烟粉虱2龄若虫的生物活性,结果表明,在孢子浓度为 $1.0 \times 10^7$  CFU/mL时,孢子加菌丝悬浮液处理的虫体死亡率最高,其72 h和120 h的平均死亡率分别为39%和62%,其次为单用孢子悬液处理,死亡率分别为35%和52%,但两者无显著差异,单用菌丝处理的死亡率最低,分别为20%和38%,与前2种处理方式结果有显著性差异,说明菌株QH1可能主要是通过孢子侵染烟粉虱虫体而表现出杀虫活性。

**关键词:**烟粉虱;病原真菌;分离鉴定;生物活性

**中图分类号:** S433.39 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)11-0148-03

烟粉虱(*Bemisia tabaci* Gennadius)广泛分布于除南极洲以外的90多个国家,是一种杂食性害虫,其寄主植物超过600种,包括棉花、多种蔬菜以及多种观赏植物和花卉<sup>[1-2]</sup>。烟粉虱危害方式多样,不仅可以直接吸取植物汁液、分泌蜜露,还可以传播多种植物病毒,给农业生产带来了严重的危害<sup>[3]</sup>。因此,如何对烟粉虱进行有效的治理和控制引起了国内外学者的广泛重视,并积极研究有效防控烟粉虱的策略和方法。实践证明一些农业和物理防治措施对预防和控制田间烟粉虱是很有效的,按照可持续控制的理念,生物防治在烟粉虱的综合防治中扮演着非常重要的角色。目前,国内外学者在烟粉虱天敌的基础研究和应用方面已经做了大量工作,并在农业生产实践中发挥着重要作用,其中病原真菌的寻找和应用是生物防治的主要研究内容之一。已报道的烟粉虱病原

真菌种类繁多,且多为丝孢菌纲,主要包括轮枝菌(*Verticillium*)、拟青霉菌(*Paecilomyces*)和座壳孢属(*Aschersonia*)的一些种类<sup>[4]</sup>。这些天敌中的很多都能取食或寄生大量烟粉虱,在控制烟粉虱时起着重要作用。

玫烟色棒束孢(*Isaria fumosorosea*)是一类较为常见的昆虫病原真菌,曾称为玫烟色拟青霉(*Paecilomyces fumosoroseus*),属于囊菌亚门核菌纲,肉座菌目,虫草菌科棒束孢属,能寄生蜚蠊目、等翅目、缨翅目、半翅目、鳞翅目、双翅目和鞘翅目等目的多种害虫<sup>[5]</sup>。玫烟色棒束孢也是常见的土壤微生物,具有较广泛的地理分布和较强的生态适应能力,因此,开发和利用该类昆虫病原真菌已成为生物防治中控制害虫危害的一个重要手段和发展趋势。目前,国外已筛选出对粉虱、蚜虫等刺吸式口器害虫高致病力的菌株,并将其应用于大田和温室的害虫防治<sup>[6]</sup>。本研究从金陵科技学院园艺站采集感染真菌死亡的烟粉虱虫体,经分离纯化得到了菌株QH1,在观察了该菌株的形态特征、菌落生长特征以及菌株显微特征的前提下,采用分子生物学手段对该菌株进行了鉴定,并初步测定了该菌株对烟粉虱的杀虫活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 烟粉虱病原真菌的分离纯化

将田间收集的死亡烟粉虱虫体放入70%乙醇中浸3~

收稿日期:2015-08-24

基金项目:江苏省高校自然科学研究面上项目(编号:14KJB210004);

江苏省南京市江宁区科技发展计划项目(编号:2015Ed01)。

作者简介:王铁军(1985—),男,湖南衡阳人,助理园艺师,主要从事汤山翠谷现代农业科技园园区农业生产与科研工作。E-mail: 122065151@qq.com。

通信作者:朱丽梅,博士,教授,主要从事园艺病虫害防治的教学与科研工作。E-mail:910703164@qq.com。

[10] Tang W, Ding Z, Zhou Z Q, et al. Phylogenetic and pathogenic analyses show that the causal agent of apple ring rot in China is *Botryosphaeria dothidea* [J]. Plant Disease, 2012, 96 (4): 486-489.

[11] Latinović J, Mazzaglia A, Latinović N, et al. Resistance of olive cultivars to *Botryosphaeria dothidea*, causal agent of olive fruit rot in Montenegro [J]. Crop Protection, 2013, 48: 35-40.

[12] 薛云飞,穆希凤,袁秀英,等. 葡萄座腔菌属真菌毒素研究进展 [J]. 中国森林病虫, 2010, 29(2): 31-34.

[13] Slippers B, Wingfield M J. Botryosphaeriaceae as endophytes and la-

tent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact [J]. Fungal Biology Reviews, 2007, 21(2): 90-106.

[14] Alves A, Phillips A J L, Henriques I, et al. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis as a method for the identification of *Botryosphaeria* species [J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 245 (2): 221-229.

[15] Denman S, Crous P W, Taylor J E, et al. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria* and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny [J]. Studies in Mycology, 2000, 45: 129-140.

5 s 后,用 0.5% 次氯酸钠消毒 3~5 min,灭菌水中连续漂洗 3 次。用无菌操作法将病虫体移至培养基平面上,每培养皿内放 3 个虫体,呈三角形,每个处理 3 个重复,翻转培养皿,放入 25℃ 恒温箱内培养 3~4 d 后,在培养皿中选择菌落,挑取少许菌丝及孢子,接种培养,反复接种纯化菌株。

## 1.2 烟粉虱病原真菌形态特征的观察

1.2.1 琼脂水法 用蒸馏水和 2% 的琼脂粉混合溶解后灭菌备用,试验前取少量融化的培养基滴加到载玻片中央,培养基应滴得尽可能圆且薄,待冷却后,吸取已配制好的稀释到一定浓度的孢子液到培养基上,放入已灭菌的装有滤纸片的培养皿中保湿培养,并置于 28℃ 的恒温箱中培养,10 h 后用显微镜观察,隔天观察 1 次,并记录孢子的萌发、菌丝体生长和产孢结构形成的过程。

1.2.2 菌落形态观察 将纯化的菌株接种于 PDA 上,于 25℃ 恒温箱内培养,记录在培养基上培养 10 d 后菌落直径大小、颜色变化,并在奥林巴斯显微镜下镜检分生孢子的形状,测量分生孢子大小以及产孢细胞大小、着生方式和形态特征等情况。

## 1.3 菌株 QH1 的分子鉴定

挑选菌株进行培养和 DNA 提取,用真菌 DNA 提取试剂盒提取基因组的 DNA。引物为真菌核糖体 rDNA 区通用引物 ITS1 (TCCGTAGCTGAACCTGCGG) 和 ITS4 (TCCTCCGCTTAT-TGATATGC),扩增 ITS1-5.8S-ITS2 rDNA 全序列及部分 18S rDNA 和 28S rDNA 序列。PCR 反应体系为 25  $\mu$ L,包括:10  $\times$  PCR 缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L KCl, 15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton-X) 2.5  $\mu$ L, 正反向引物各 1  $\mu$ L, PCR 反应液 2  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 0.5  $\mu$ L, 0.5 U *Taq* DNA 聚合酶 0.5  $\mu$ L, 加去离子水补足 25  $\mu$ L。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; 最后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后回收片段并连接到克隆载体 pEASY T3 上,挑取阳性克隆进行测序。

## 1.4 菌株 QH1 对烟粉虱杀虫活性的测定

1.4.1 孢子悬浮液的制备 取已培养好的斜面菌种 1 支,加入 5 mL 无菌水,轻轻将琼脂表面的孢子刮下,将该孢子悬浮液置于已灭菌的 50 mL 三角瓶内,瓶中预先放置数粒无菌玻璃球,充分振摇后用灭菌的脱脂棉过滤,并用无菌水冲洗滤渣 2~3 次,最终使滤液体积达到 10 mL,即得孢子悬浮液,试验前将孢子悬液浓度调整为  $1.0 \times 10^7$  CFU/mL。

1.4.2 烟粉虱杀虫活性的测定方法 本试验采用浸渍法,将带有 2 龄烟粉虱若虫的黄瓜叶片浸入悬液中,对照浸入无菌水中,10 s 后取出,自然晾干。每处理为 1~2 片叶,每叶 50~100 头若虫,3 次重复。置于透明的保鲜盒内。再置于 (25  $\pm$  0.5)℃ 的光照培养箱中 (光-暗周期 14 h-10 h)。每日镜检并记录被分离真菌感染死亡的虫数,计算侵染率,连续观察 7 d。

1.4.3 数据统计与分析 根据所观察试验结果数据计算接种后烟粉虱的死亡率,并以 Abbott 公式进行校正:

$$\text{校正死亡率} = \frac{\text{处理组死亡率} - \text{对照组死亡率}}{1 - \text{对照组死亡率}} \times 100\%。$$

## 2 结果与分析

### 2.1 烟粉虱病原真菌的分离

通过保湿培养后幼虫身体被丝绒体充满和覆盖着,经分离纯化获得了菌株 QH1。

### 2.2 分离菌株的形态鉴定

在 PDA 培养基上,菌落生长快,25℃ 下 14 d 时菌落直径可达 64.5 mm,长绒毛状,形成孢子后呈肉红色、粉状、背面无色或黄色,一些菌株易形成分枝的粉红色孢梗束, (3~4)  $\mu$ m  $\times$  (1~2)  $\mu$ m。培养 10 d 的菌落直径达到 22 mm,菌落呈绒毛状,颜色乳白色 (图 1),孢子形态分散或呈链状分布 (图 2)。分生孢子梗为瓶状结构,单生或聚集成孢梗束,壁光滑且透明,大部分为着生 4 个瓶梗组成轮生体的轮状分枝 (图 3)。瓶梗基部球状,或拟椭圆形膨大,上部细长。分生孢子柱梭形、光滑、透明至微淡红色,在瓶梗上形成孢子链,产孢细胞着生在柄细胞或者直接着生于菌丝上,呈烧瓶形,产孢细胞平均长为 6.9  $\mu$ m、宽为 2.5  $\mu$ m,孢子平均长为 3.8  $\mu$ m、宽为 2.1  $\mu$ m,菌丝平均宽度为 2.6  $\mu$ m,根据上述形态学特征,分离菌株 QH1 初步鉴定为拟青霉属。



图1 分离菌株在 PDA 培养基上的菌落形态

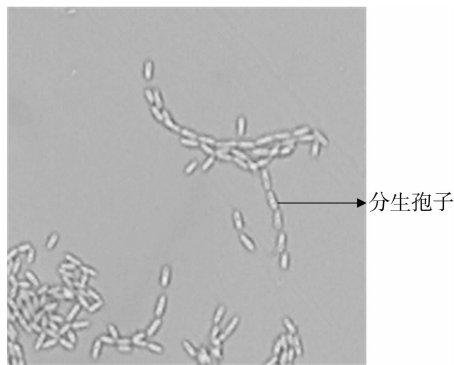


图2 分离菌株的孢子形态

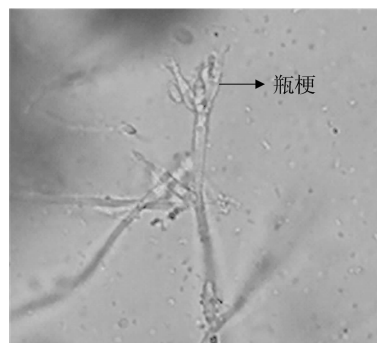


图3 分离菌株的分生孢子梗

2.3 分离菌株的测序序列比对结果分析

PCR 产物测序结果表明,该菌株 ITS 序列长度为 550 bp。将该序列在 Gen Bank 中登录(登录号为:X2UF23JT014,序列比对号为 query-6465)进行 Blast 同源性比较。Blast 比对结果表明,其序列和 GenBank 库中登录的 9 个菌株的 DNA 序列为 100% 同源。从 100 个序列中选取相似性最高的 9 个菌株

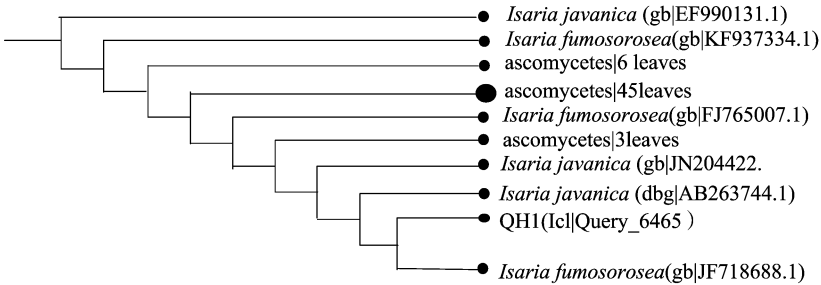


图4 菌株QH1(比对号Query-6465)与棒束孢属种间的系统发育树

2.4 分离菌株对烟粉虱的侵染活性

对烟粉虱的侵染活性测定结果表明,用浓度为  $1.0 \times 10^7$  CFU/mL 的分生孢子悬浮液、分生孢子和菌丝混合液、菌丝混合液侵染烟粉虱 2 龄若虫后,烟粉虱累计死亡率见表 1。不同时间的累计死亡率数据显示,孢子加菌丝处理的虫体死亡率较高,其 72 h 和 120 h 的平均死亡率分别为 39% 和 62%,菌丝处理虫体的 72 h 和 120 h 死亡率分别为 20% 和 38%,2 种处理方式结果有显著性差异;单用分生孢子菌悬液处理的虫体,其 72 h 和 120 h 的平均死亡率分别为 35% 和 52%,略差于分生孢子加菌丝悬液处理的虫体死亡率,但差异不显著,与单用菌丝处理的虫体死亡率差异显著。说明菌株 QH1 可能主要是通过孢子侵染烟粉虱虫体而表现出杀虫活性。

表 1 玫烟色棒束孢 QH1 的不同处理对烟粉虱 2 龄若虫杀虫活性的比较

处理	校正死亡率 (%)	
	72 h	120 h
分生孢子 + 菌丝悬液	0.39a	0.62a
分生孢子悬液	0.35a	0.52ab
菌丝悬液	0.20b	0.38b

3 结论与讨论

在自然界中,玫烟色棒束孢可在昆虫尸体和土壤中存活一段时间,当环境适宜时产孢,形成新的侵染,并可在自然生境和农业生态系统中形成流行病,在害虫防治中具有重要的作用<sup>[5]</sup>。

本研究分离的菌株 QH1 根据形态学特征初步鉴定为拟青霉属,通过 rDNA-ITS 序列和同源性检索,发现该菌株与玫烟色棒束孢相似性为 100%。因此可以推断该菌株为玫烟色棒束孢。目前国内有关玫烟色棒束孢在农业害虫防治中的应用研究包括孟瑞霞等、田晶等应用其防治烟粉虱的报道<sup>[6-7]</sup>,孟豪等防治桃蚜的研究<sup>[8]</sup>以及黄建华等测定的对小菜蛾生物活性的研究<sup>[9]</sup>等,但与大规模的田间应用还有一定

的差距。序列进行系统学分析,构建进化树(图 4),包括爪哇棒束孢 EF990131.1、937334.1、FJ765007.1 以及 JF718688.1 等,发现与 GenBank 报道的 1 株玫烟色棒束孢(*Isaria fumosorosea*) (登录号:JF718688.1) 的 ITS 序列表现出极高的同源性,处于系统发育树的同一分支,因此结合形态学特征,进一步确定该菌株为玫烟色棒束孢(*Isaria fumosorosea*)。

的差距。

本研究菌株 QH1 初步的生物活性测定结果表明,该菌株对烟粉虱具有较强的侵染能力,处理 1 周后,虫体产生大量白色菌丝死亡。在孢子浓度一致的条件下,分生孢子加菌丝悬浮液和分生孢子悬浮液对烟粉虱的侵染活性与菌丝悬浮液处理的相比差异显著,而分生孢子加菌丝悬浮液和分生孢子悬浮液处理间差异不显著,但分生孢子加菌丝悬浮液对烟粉虱的杀虫活性强于单用分生孢子悬浮液,说明菌株 QH1 可能主要是通过孢子侵染烟粉虱虫体而表现出杀虫活性。本试验只对该菌株的生物活性进行了初步研究,关于其活性、杀虫谱以及田间试验效果尚需进一步探讨。

参考文献:

[1] 武淑文,王震宇,吴益东. B 和 Q 型烟粉虱种群竞争与抗药性的关系[J]. 昆虫知识,2010,47(6):1118-1121.  
[2] 赵莉,张荣,肖艳,等. 危害棉花的重要害虫烟粉虱在新疆的发现[J]. 新疆农业科学,2000(1):127-28.  
[3] 顾宝根. 烟粉虱传播联体病毒[J]. 世界农业,1995(6):33-34.  
[4] 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.  
[5] Zimmermann G. The entomopathogenic fungi *Isaria farinose* (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(37):865-901.  
[6] 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):80-84.  
[7] 田晶,梁丽,李新风,等. 玫烟色棒束孢 IF-1106 菌株对烟粉虱的致病力[J]. 山西农业科学,2013,41(7):728-731.  
[8] 孟豪,田晶,付淑慧,等. 玫烟色棒束孢与球孢白僵菌对桃蚜致病力对比[J]. 植物保护学报,2014,41(6):717-722.  
[9] 黄建华,罗任华,秦文婧,等. 玫烟色棒束孢对小菜蛾的致病力[J]. 江西农业学报,2012,24(10):62-64.