

美国白蛾高毒力球孢白僵菌菌株筛选

张龙娃^{1,*}, 康克¹, 刘玉军^{1,3}, 张晶¹, 孙龙¹, 詹成¹,
黄长春², 蒋丽雅², 叶开云⁴, 丁德贵²

(1. 安徽农业大学林学与园林学院, 安徽省微生物防治重点实验室, 合肥 230036; 2. 安徽省林业有害生物防治检疫局, 合肥 230001; 3. 安徽省科学技术研究院, 合肥 230031; 4. 无为县林业局, 安徽无为 238000)

摘要:【目的】美国白蛾 *Hyphantria cunea* (Drury) 是世界性检疫害虫, 目前已经入侵到我国长江下游地区(从辽宁丹东至安徽芜湖)。作者在前期研究中, 在芜湖地区成功获得了被球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 侵染的美国白蛾僵虫。本研究拟在前期已获取菌株的基础上, 筛选生物学性状良好且对美国白蛾幼虫具有高致病力的球孢白僵菌菌株, 以期为我国长江下游地区利用昆虫病原真菌防治美国白蛾奠定基础。【方法】对采集自美国白蛾僵虫的 7 株球孢白僵菌菌株 (Bb01-1, Bb08-5, Bb08-6, Bb08-11, Bb22-2, Bb22-3 和 Bb22-5) 进行生物学特性研究, 以候选菌株菌落形态、生长速率、产孢量、萌发率和抗紫外能力等参数确定优良菌株; 并将生物学性状良好的球孢白僵菌菌株配制成 5 个浓度 (5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 和 5×10^8 孢子/mL) 的孢悬液, 采用浸渍法处理美国白蛾 4 龄幼虫, 以幼虫死亡率、侵染率等指标评价菌株的致病力。【结果】供试菌株 Bb22-2, Bb22-3 和 Bb22-5 为粉状菌落, 其菌落直径大, 产孢早且孢子层厚; 同时, 这 3 个菌株在菌落生长速率和产孢量以及孢子萌发率、紫外照射处理后的萌发率也均显著优于其他 4 个菌株。毒力测定结果表明, 这 3 个菌株对美国白蛾 4 龄幼虫表现出很强的致病力, 各菌株处理 11 d 后美国白蛾幼虫校正死亡率为 80% ~ 90%。这 3 个菌株对美国白蛾幼虫的侵染率均高 (侵染率 53% ~ 87%), 并且呈现随浓度升高侵染率上升的趋势。其中, 菌株 Bb22-2 侵染率均要高于其他 2 个菌株。【结论】本研究成功筛选获得了生物学性状良好且对美国白蛾高毒力的球孢白僵菌菌株。鉴于中国长江下游地区气候特点与美国白蛾生物学习性, 可以预期采用昆虫病原真菌防治美国白蛾在该地区将具有很好的应用前景, 但其实际应用价值尚需进一步的田间试验进行确认。

关键词: 美国白蛾; 球孢白僵菌; 菌株; 生物学性状; 毒力测定

中图分类号: Q965.8 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2016)01-0111-08

Evaluation of *Beauveria bassiana* isolates as potential agents for control of *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae)

ZHANG Long-Wa^{1,*}, KANG Ke¹, LIU Yu-Jun^{1,3}, ZHANG Jing¹, SUN Long¹, ZHAN Cheng¹, HUANG Chang-Chun², JIANG Li-Ya², YE Kai-Yun⁴, DING De-Gui² (1. Anhui Provincial Key Laboratory of Microbial Pest Control, School of Forestry and Landscape Architecture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2. Forest Pests Control and Quarantine Bureau of Anhui Province, Hefei 230001, China; 3. Anhui Academy of Science and Technology, Hefei 230031, China; 4. Forestry Bureau of Wuwei County, Wuwei, Anhui 238000, China)

Abstract: 【Aim】The fall webworm, *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera: Arctiidae), a destructive

基金项目: 安徽省自然科学基金项目 (1508085SMC216); 国家自然科学基金项目 (31170616, 31000304, 31200490); 安徽省林业有害生物防治检疫局委托项目; 国家级大学生创新创业训练计划项目 (201510364005)

作者简介: 张龙娃, 男, 1977 年 1 月生, 山西临汾人, 博士, 副教授, 研究方向为生物入侵与生物防治, E-mail: zhanglw@ahau.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhanglw@ahau.edu.cn

收稿日期 Received: 2015-10-13; 接受日期 Accepted: 2015-11-25

invasive pest and native to North America, has spread from Dandong city, Liaoning province of northeastern China to Wuhu city, Anhui province of southeastern China. Effective control measures are urgently needed. In this study, *Beauveria bassiana* isolates from *H. cunea* were examined for biological characteristics and virulence, to assess their potential as a bio-control agent for *H. cunea*. 【Methods】 The biological characteristics of seven isolates (Bb01-1, Bb08-5, Bb08-6, Bb08-11, Bb22-2, Bb22-3 and Bb22-5), including colony morphology, growth rate, conidial yield, conidial germination and tolerance to UV light, were examined. Then, three isolates with better performance were selected for bioassays against the 4th instar larvae of *H. cunea*. 【Results】 There were significant differences in colony growth rate, conidial yield, conidial germination and tolerance to UV light among the tested *B. bassiana* isolates. The isolates Bb22-2, Bb22-3 and Bb22-5 exhibited better characteristics with faster hyphal growth rate, higher spore production, faster spore germination and higher UV tolerance. The results of pathogenicity test of *B. bassiana* to the *H. cunea* larvae showed that the three isolates of *B. bassiana* demonstrated a higher efficacy. The three isolates caused the corrected mortality rates of 80% – 90% in *H. cunea* at 11 d post inoculation. And the infection rates of *B. bassiana* against *H. cunea* were between 53% and 87% at 11 d post inoculation. The isolate Bb22-2 caused higher infection rates of *B. bassiana* against *H. cunea* than the other two isolates. 【Conclusion】 This study demonstrated that *B. bassiana* is a highly effective entomopathogen against *H. cunea*. The isolate Bb22-2 has a great potential for sustainable control of *H. cunea* in forests. Further field experiments are needed to investigate its efficacy under natural conditions.

Key words: *Hyphantria cunea*; *Beauveria bassiana*; fungal isolate; biological characteristics; virulence

美国白蛾 *Hyphantria cunea* (Drury) 是世界性检疫害虫。1979 年美国白蛾在我国辽宁省丹东市首次被发现。此后, 美国白蛾分别于 1981, 1984, 1989, 1993, 2003 及 2008 年入侵山东荣城、陕西武功、河北山海关、天津、北京、河南濮阳等地 (季荣等, 2003)。2012 年 7 月在安徽省芜湖市三山区发现了安徽省首例美国白蛾疫情。至此, 美国白蛾已经向南扩散到长江下游地区, 安徽芜湖则成为美国白蛾在我国分布的最南端。按照国家林业局公告 (2015 年第 2 号) 公布的最新数据, 2014 年在安徽省、江苏省及辽宁省又有新的美国白蛾县级疫区被确认。美国白蛾发生范围呈现日益扩大的态势, 并不断向新的生态区蔓延。鉴于美国白蛾发生的严峻形势, 加强美国白蛾的防控技术研究更显迫切。

对于美国白蛾的防治, 常规防治主要采用飞机及地面喷施化学农药进行控制, 其效果往往短时间内抑制了美国白蛾种群密度, 但是从长远看却带来诸多负面效果, 如环境污染、大量杀死天敌等 (刘永清等, 2013; 白鹏华等, 2015)。另外, 美国白蛾在我国多发生在城市和居民区的绿化树木及植物上, 因而不能使用对环境、人畜有害的化学农药; 同时, 在我国长江下游地区水产养殖 (虾、蟹等) 发达, 对化学农药的使用有严格限制, 即使一些对环境较安全的仿生型农药也不能使用 (杨忠岐和张永安, 2007)。伴随着森林健康理念的发展, 美国白蛾生

物防治日益受到重视。其中, 杨忠岐和张永安 (2007) 利用当地天敌——周氏啮小蜂防治美国白蛾成为以“当地天敌”防治“入侵种”的成功范例, 打破了传统的从原产地引进天敌的模式。另外, 杨忠岐和张永安 (2007) 采用美国白蛾核型多角体病毒 (HcNPV) 防治美国白蛾也取得了显著的防治效果。上述研究促进了我国利用天敌防治美国白蛾技术的发展, 使我国生物防治技术达到了国际先进水平 (季荣等, 2003)。

昆虫病原真菌是昆虫病原微生物中最大的类群, 已经成功应用于对多种农林害虫的防治 (蒲蛰龙和李增智, 1996; Shah and Pell, 2003; Dubois *et al.*, 2004; Batta, 2007; Dolinski and Lacey, 2007; Pilz *et al.*, 2007; Vu *et al.*, 2007; Liu and Bauer, 2008; 刘玉军等, 2008; Shanley *et al.*, 2009; Hamiduzzaman *et al.*, 2012; Hussain *et al.*, 2014; Erler and Ates, 2015)。昆虫病原真菌作为美国白蛾生物防治措施, 具有可自身增殖、不污染环境、不伤害天敌、易于生产等优点。目前, 关于美国白蛾病原真菌的研究仅有零星报道, 且集中在美国白蛾北方疫区北京、天津等地 (国志峰等, 2010; 刘宝生等, 2011; 王伦, 2011; 覃丰全等, 2012; 刘永清等, 2013; 白鹏华等, 2015)。与我国北方气候干燥少雨不同, 我国长江下游地区气候温暖湿润, 为昆虫病原真菌的应用创造了良好环境条件, 昆虫病原真

菌在未来我国长江下游地区美国白蛾防治中的应用前景值得关注。

在所有昆虫病原真菌中,球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 应用最为广泛(刘玉军等, 2008)。作者自 2012 年起,对美国白蛾在安徽芜湖地区的天敌资源进行了调查,采集获得了多株美国白蛾病原真菌,其中以球孢白僵菌最为普遍。鉴于球孢白僵菌存在寄主专化性,筛选适合长江下游地区美国白蛾专化性强且致病力高的菌株成为迫切解决的问题。同时,菌株的生物学性状与未来制剂化生产存在密切关系。因此,本文在前期获得美国白蛾病原真菌菌株的基础上,对各个菌株的生物学特性、抗紫外线能力等进行了评价;随后,选择生物学性状良好的菌株测定其对美国白蛾幼虫的致病力。本研究成功筛选获得了生物学性状优良且对美国白蛾高毒力的球孢白僵菌菌株,为今后野外应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫与菌株

从安徽省芜湖市鸠江区白茆镇,采集美国白蛾卵及初孵幼虫带回室内,采用新鲜桑叶喂食(饲养条件:25 ± 1℃、相对湿度 60% ± 1%,光周期 16L:8D),直至 4 龄幼虫,供生物测定使用。

供试球孢白僵菌 *B. bassiana* 菌株均分离自被病原真菌感染的美国白蛾僵蛹;采集地点为安徽省芜湖市鸠江区白茆镇。采集获得的美国白蛾僵虫经分离纯化,通过形态学鉴定(蒲蛰龙和李增智, 1996),确定了 7 株球孢白僵菌菌株(Bb01-1, Bb08-5, Bb08-6, Bb08-11, Bb22-2, Bb22-3 和 Bb22-5)。上述菌株均保存于安徽省微生物防治重点实验室菌种库。

1.2 不同菌株的生物学特性研究

1.2.1 菌落生长性状与生长速率:将供试菌株接种于配制好的 PPDA 培养基(马铃薯 200 g,葡萄糖 30 g,琼脂 20 g,酵母 10 g 和水 1 000 mL)培养皿(直径 9 cm)中,每株菌株 3 个重复,置于 25 ± 1℃ 恒温培养箱内培养;每天观察记录菌落的生长、色泽、形态和产孢等情况;分别于接种培养的第 7,10 和 14 天,采用十字交叉法测量菌落生长直径。

1.2.2 产孢量的测定:将供试菌株接种于 SDAY 培养基(葡萄糖 40 g,蛋白胨 10 g,酵母浸膏 10 g,琼脂 20 g 和水 1 000 mL)上培养 14 d。随后采用直径为 4 mm 的打孔器在菌落中心至边缘 1/2 处打孔截取小菌块,放入装有 20 mL 无菌 0.05% 吐温-80 溶液

的小三角瓶中。用漩涡振荡器分散孢子,获孢子悬浮液。将孢悬液滴在血球计数板上,在显微镜下观察计数;每株菌株重复 3 次。

1.2.3 孢子萌发率测定:配制 2% 水琼脂,用微量移液器移取 300 μL 至载玻片上,涂布均匀,冷却备用。用 0.05% 吐温-80 溶液把菌株的孢子从菌落表面洗脱,在显微镜下观察,配制成浓度为 1.0×10^6 孢子/mL 孢悬液;用微量移液器吸取 10 μL 滴至涂有 2% 琼脂的载玻片上,放在相对湿度 100% 的容器内悬滴培养,置于 25 ± 1℃ 恒温下培养;24 h 后在显微镜下取 10 个不同视野统计孢子萌发率。每株菌株 3 个重复。

1.2.4 紫外照射对孢子萌发的影响:取上述配制好的 1.0×10^6 孢子/mL 孢悬液 10 mL 加入培养皿(直径 9 cm),放置于置于紫外灯(18 W,最大波长 240 ~ 260 nm,顺德市本邦电器有限公司)下照射 6 h,培养皿与灯管间距 25 cm;照射结束后,采用微量移液器取 10 μL 孢悬液至有 2% 琼脂的载玻片上,置于相对湿度为 100% 的容器内悬滴培养,置于 25 ± 1℃ 恒温下培养。孢子萌发率观察方法同上。

1.3 生物测定

选择生物学性状良好的菌株(Bb22-2, Bb22-3 和 Bb22-5)用于进一步的生物测定。将在 SDAY 培养基上培养获得的供试菌株孢子粉,分别溶于 0.05% 的吐温-80 溶液中,配制成终浓度分别为 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 和 5×10^8 孢子/mL 共 5 个梯度的孢子悬浮液;以吐温-80 溶液作为空白对照。采取浸渍法接种,将美国白蛾 4 龄幼虫分别在相应浓度的孢悬液中浸渍后,迅速放入聚乙烯塑料养虫杯(上口直径 11 cm,下口直径 8.5 cm,高 7.5 cm)内,养虫杯置于湿度 90% ± 1% 的人工气候室内;美国白蛾幼虫以经无菌水冲洗的桑叶饲喂;每个浓度菌株各处理 10 头幼虫,重复 3 次。从接种第 2 天开始,每天观察、记录各个处理的幼虫死亡情况;及时移出死亡幼虫,并放置于有湿滤纸的培养皿中保湿培养。上述试验持续观察 12 d。最后,统计各处理组的不同时间死亡幼虫数和受侵染幼虫数等。

1.4 数据处理

根据生物测定数据,分别计算不同处理幼虫的死亡(侵染)率,并以 Abbott 公式进行校正,即:

$$\text{死亡率} = \frac{\text{处理死亡幼虫数}}{\text{处理总虫数}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{校正死亡率} = \frac{\text{处理死亡率} - \text{对照死亡率}}{1 - \text{对照死亡率}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{侵染率} = \frac{\text{受侵染虫数}}{\text{处理总虫数}} \times 100\% \quad (3)$$

为满足正态分布和方差齐性,对本文有关菌落生长速率、产孢量等数据采用 $\log(x+1)$ 转换;而孢子萌发率、死亡率等数据采用反正弦平方根转换;方差分析均采用 Duncan 氏多重比较;所有数据均采用 SPSS. 13 (SPSS Inc. 2004) 软件进行计算。

2 结果

2.1 供试球孢白僵菌菌株生物学特性

2.1.1 菌落形态:供试的 7 株球孢白僵菌菌株在菌落形态上存在较大不同。大致可以划分为 3 种类

型:疏松型菌落、粉状型菌落和紧密型菌落。其中,疏松型菌落的直径小,产孢少;粉状型菌落直径大,产孢早且孢子层厚;紧密型菌落介于疏松型菌落和粉状型菌落之间(表 1)。其中,菌株 Bb22-2, Bb22-3 和 Bb22-5 属于粉状型菌落。

2.1.2 菌株生长量和产孢量:由图 1 结果可以看出,供试菌株在生长的初期(第 7 天),其营养生长速率差异很小;而在后期(第 10-14 天)其差异逐渐显现;第 14 天时,菌株 Bb22-2, Bb22-3 和 Bb22-5 菌落直径显著高于其他菌株,均达到了 36 mm 以上。方差分析($F=40.91$, $df=6$, $P<0.001$)表明,菌株 Bb22-2 生长速率最快;菌株 Bb22-3 和 Bb22-5 的生长速率次之。

表 1 供试球孢白僵菌菌株菌落形态

Table 1 Colony morphological characteristics of the tested strains of *Beauveria bassiana*

菌株 Strains	菌落类型 Colonial type	菌落色泽 Colony color	菌落形态 Colony texture	基质色泽 Substrate color
Bb01-1	紧密型 Compact type	白色 White	毡状 Felt-like	淡黄色 Light yellow
Bb08-5	疏松型 Loose type	乳白略黄 Yellowish white	绒毛状 Villous-like	黄色 Yellow
Bb08-6	疏松型 Loose type	乳白略黄 Yellowish white	绒毛状 Villous-like	黄色 Yellow
Bb08-11	疏松型 Loose type	白色 White	绒毛状 Villous-like	淡黄色 Light yellow
Bb22-2	粉状型 Powder type	乳白 Creamy white	薄粉状 Thin powder-like	黄色 Yellow
Bb22-3	粉状型 Powder type	乳白 Creamy white	薄粉状 Thin powder-like	淡黄色 Light yellow
Bb22-5	粉状型 Powder type	乳白 Creamy white	薄粉状 Thin powder-like	淡黄色 Light yellow

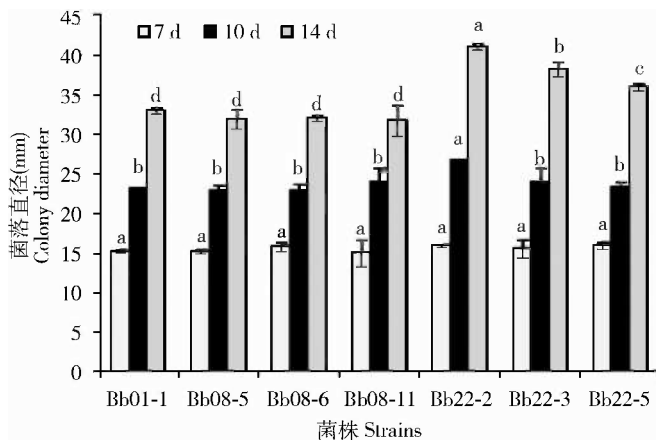


图 1 球孢白僵菌不同供试菌株的生长速率

Fig. 1 Colony growth speeds of the tested strains of *Beauveria bassiana*

图中数据为平均值 \pm 标准差;柱上不同字母表示差异显著,小写字母表示同一时间或同一处理的数值在 0.05 水平上差异显著 (Duncan 氏多重比较)。图 2 和 3 同。Data in the figure are mean \pm SD. Different letters above bars denote significant difference at the same time or the same treatment at the 0.05 level, by ANOVA followed by Duncan's test. The same for Figs. 2 and 3.

供试菌株产孢量测定表明(图 2),菌株 Bb22-2, Bb22-3 和 Bb22-5 的产孢量明显高于其他菌株($F=241.95$, $df=6$, $P=0.001$);其中,产孢量最高的菌株为 Bb22-2,其产孢量是菌株 Bb08-6 的 4 倍。

2.1.3 不同条件下菌株萌发率的比较:由图 3 结果可知,在相对湿度为 100% 时,供试菌株 24 h 孢子萌

发率均在 77% 以上;菌株 Bb22-2, Bb22-3 和 Bb22-5 的孢子萌发率显著高于其他 4 个菌株($F=22.70$, $df=6$, $P<0.001$);其中,以菌株 Bb22-2 的孢子萌发率最高,达到了 91.59%。

经过紫外照射后,供试菌株的孢子萌发率都显著下降,例如菌株 Bb22-2 的萌发率仅为紫外照射之

前的 1/3。经紫外照射后,不同菌株抗紫外线能力分化明显 ($F = 42.66$, $df = 6$, $P < 0.001$), 同样以菌株 Bb22-2 抗紫外能力最强, Bb22-3 和 Bb22-5 次之; 经照射后, 菌株 Bb22-2 的萌发率为菌株 Bb08-11 的 2 倍。

2.2 美国白蛾幼虫被感染症状

生物测定结果表明, 美国白蛾幼虫被球孢白僵

菌感染初期, 表现为行为迟缓、活动能力逐渐减弱; 染病 2~3 d 后, 美国白蛾幼虫虫体逐渐僵硬, 直至死亡; 幼虫死后不久虫体出现白色斑点 (图 4: A); 接下来 1~2 d, 幼虫虫体长出白色菌丝; 最后, 菌丝逐渐布满全身, 直至产生白色孢子 (图 4: B)。

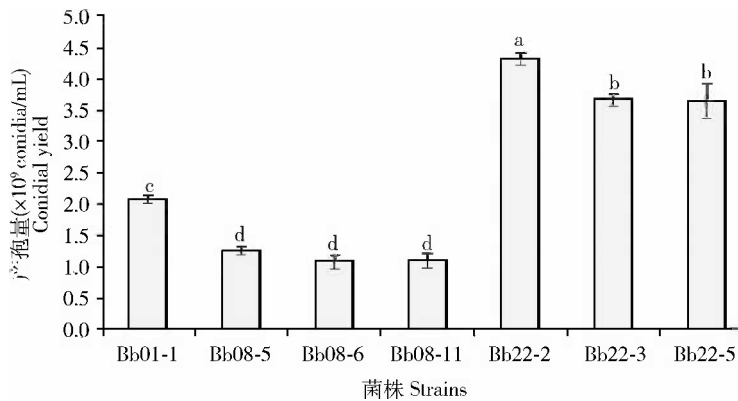


图 2 球孢白僵菌不同供试菌株的产孢量

Fig. 2 Conidial yields of the tested strains of *Beauveria bassiana*

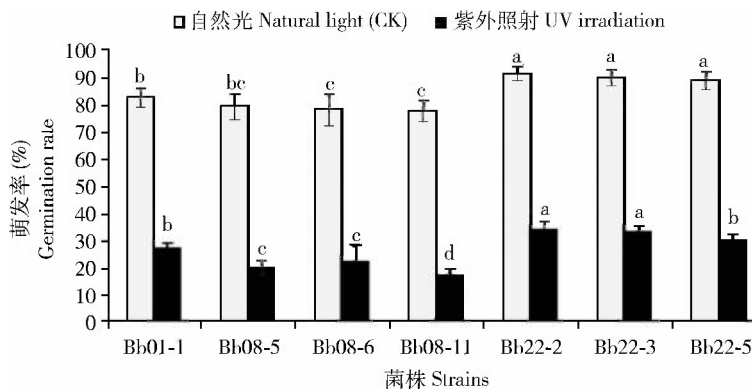


图 3 球孢白僵菌供试菌株在自然光及紫外光照射下 24 h 后的萌发率

Fig. 3 Germination of the tested strains of *Beauveria bassiana* under natural light and UV for 24 h



图 4 美国白蛾幼虫被球孢白僵菌侵染后的症状

Fig. 4 Symptoms of *Hyphantria cunea* larvae infected by *Beauveria bassiana*

A: 侵染初期 Early infection stage; B: 侵染后期 Late infection stage.

2.3 不同菌株对美国白蛾幼虫致病力分析

毒力测定表明(表2):3株球孢白僵菌菌株(Bb22-2, Bb22-3和Bb22-5)对美国白蛾4龄幼虫均表现出很强的致病力。处理1d后,美国白蛾幼虫死亡率最高达到了43%以上(菌株Bb22-2在浓度 1×10^8 孢子/mL时);处理3d后,菌株Bb22-2(浓度 1×10^8 孢子/mL)致使100%的幼虫死亡;处理5d后,各处理组死亡率最低达66.67%;处理11d后,处理组幼虫死亡率几乎为100%;而对照组,幼虫仅在9d后才有零星个体死亡。

各菌株处理11d后,幼虫校正死亡率除菌株

Bb22-5在最低浓度(5×10^6 孢子/mL)以外(为80%),其余2种菌株(Bb22-2和Bb22-3)在各个浓度下菌株死亡率均为90%。

评价菌株对美国白蛾幼虫侵染力的直接证据是,死亡后的幼虫是否表现出僵虫的症状,即统计白僵菌对美国白蛾幼虫的侵染率。侵染率分析表明(表2),3个菌株对美国白蛾幼虫的侵染率均高(侵染率53%~87%),并且呈现随浓度升高侵染率上升的趋势。其中,菌株Bb22-2在各个浓度水平下的侵染率均要高于其他2种菌株的侵染率。

表2 处理后不同时间不同菌株对美国白蛾幼虫的致病力

Table 2 Pathogenicity of the tested strains of *Beauveria bassiana* against *Hyphantria cunea* larvae at different time post treatment

菌株 Strains	浓度(孢子/mL) Concentration (number of spores/mL)	接种后不同时间的死亡率(%) Morality at indicated days after inoculation						校正死亡率 (%) Corrected morality	侵染率* (%) Infection rate
		1 d	3 d	5 d	7 d	9 d	11 d		
Bb22-2	5×10^6	30.00 ± 10.00	73.33 ± 5.77	73.33 ± 5.77	86.67 ± 5.77	93.33 ± 5.77	100.00 ± 0.00	90	73.3
	1×10^7	23.33 ± 15.28	73.33 ± 23.09	90.00 ± 10.00	96.67 ± 5.77	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	90	80.0
	5×10^7	0.00 ± 0.00	30.00 ± 43.59	76.67 ± 20.82	96.67 ± 5.77	96.67 ± 5.77	100.00 ± 0.00	90	90.0
	1×10^8	43.33 ± 15.28	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	90	83.3
	5×10^8	40.00 ± 20.00	96.67 ± 5.77	96.67 ± 5.77	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	90	86.7
Bb22-3	5×10^6	10.00 ± 0.00	43.33 ± 11.55	66.67 ± 5.77	83.33 ± 5.77	93.33 ± 11.55	100.00 ± 0.00	90	66.7
	1×10^7	23.33 ± 15.28	80.00 ± 17.32	96.67 ± 5.77	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	90	73.3
	5×10^7	20.00 ± 10.00	76.67 ± 23.09	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	90	76.6
	1×10^8	23.33 ± 15.28	80.00 ± 10.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	90	73.3
	5×10^8	33.33 ± 30.55	96.67 ± 5.77	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	90	70.0
Bb22-5	5×10^6	3.33 ± 5.77	23.33 ± 25.17	66.67 ± 32.15	73.33 ± 28.87	86.67 ± 23.09	90.00 ± 17.32	80	53.3
	1×10^7	16.67 ± 11.55	66.67 ± 40.41	83.33 ± 28.87	96.67 ± 5.77	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	90	56.7
	5×10^7	10.00 ± 10.00	63.33 ± 15.28	93.33 ± 11.55	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	90	73.3
	1×10^8	10.00 ± 10.00	73.33 ± 5.77	90.00 ± 10.00	93.33 ± 5.77	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	90	73.3
	5×10^8	33.33 ± 20.82	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	90	76.7
0.05% Tween 80 (CK)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	6.67 ± 11.55	10.00 ± 17.32	-	-	

* 侵染率指经昆虫病原真菌处理后,将死亡幼虫继续保湿培养,最终产生孢子并表现出典型僵虫症状的幼虫数占总处理虫数的比率。* The infection rate represents the percent of the number of the cadavers showing the white muscardine symptoms and producing new spores, accounting for the total number of *H. cunea* larvae treated by *B. bassiana*.

3 讨论

球孢白僵菌作为美国白蛾的重要寄生性天敌,在自然界普遍存在(杨忠岐和张永安,2007;刘宝生等,2011;王伦,2011;覃丰全等,2012;白鹏华等,2015)。本研究通过对采集的美国白蛾病原真菌进行生物学特性与毒力测定研究,成功筛选获得了生物学性状好且对美国白蛾幼虫致病力高的球孢白僵菌菌株,尤其以菌株Bb22-2的表现更为突出。在昆虫病原真菌筛选时,菌株的生物学性状(如菌落形态、产孢量等)与菌株毒力间存在相关性,已被

众多研究证实(刘玉军等,2008)。例如菌落呈薄粉状质地的菌株常表现出高毒力;菌株生长速率快、产孢量高、孢子萌发速率高的菌株也常具有更强的毒力。本研究结果也支持了上述关于菌株生物学性状与其毒力相关性的推论,即菌株Bb22-2不仅生长速率高、产孢量高,而且对美国白蛾高龄幼虫表现出很强的毒力。菌株生长速率、产孢量以及孢子萌发速率也是决定一种菌株生产应用价值的关键。在工业化生产或者林间应用时,生物学性状良好的菌株往往具有易于培养、生产效果高及再侵染扩散能力强的优势。另外,菌株抗紫外线能力是衡量菌株抗逆性的一个重要指标,在菌株产业化应用时也必须加

以考虑。

刘宝生等(2011)以美国白蛾 1 龄幼虫作为供试昆虫,采用孢子浓度为 1×10^7 孢子/mL 的球孢白僵菌处理后,第 3-5 天的幼虫死亡率为 25.47% ~ 79.32% (刘宝生等, 2011);刘永清等(2013)以孢子浓度为 1×10^8 孢子/mL 的球孢白僵菌处理美国白蛾 5 龄幼虫,第 3-5 天的幼虫死亡率为 10.0% ~ 60% (刘永清等, 2013)。本研究以美国白蛾 4 龄幼虫为供试昆虫,在 1×10^7 孢子/mL 和 1×10^8 孢子/mL 剂量处理后,第 3-5 天的幼虫死亡率分别为 66.77% ~ 96.67% 和 73.33% ~ 100%。上述结果表明,球孢白僵菌对美国白蛾幼虫(1-5 龄)均表现出很强的致病力。美国白蛾存在明显的世代重叠现象,即同一时期初孵幼虫及末龄幼虫可能同时存在;球孢白僵菌对美国白蛾高龄幼虫也表现良好毒杀效果,说明球孢白僵菌在林间实际应用时,虫龄不整齐的问题并不一定会影响其防治效果。

对于我国长江下游地区而言,采用昆虫病原真菌作为美国白蛾生物防治措施,具有其自身的独特优势。首先,昆虫病原真菌具有对环境友好、可自身增殖和实现持续控制等优势。其次,从气候条件上看,相对于我国北方干燥少雨的气候特点,我国长江下游地区湿润多雨有利于昆虫病原真菌的增殖和扩散,并可能进一步形成病原真菌的自然流行,从而弥补化学农药的缺陷(刘永清等, 2013)。另外,美国白蛾具有下树化蛹的习性,其老熟幼虫化蛹前会沿着树干向下爬行到地面寻找化蛹场所(季荣等, 2003);美国白蛾往往集中于一些卫生环境差、池塘水沟遍布区域,这些区域林地环境复杂,存在大量地表覆盖物(如砖石瓦砾、枯枝落叶、柴垛、废弃物等)。上述地表覆盖物正好为美国白蛾提供了良好的化蛹场所,往往也是美国白蛾化学药剂防治的死角(刘永清等, 2013)。而美国白蛾化蛹场所的微环境,对昆虫病原真菌的侵染和增殖则是有利的(覃丰全等, 2012);本研究中所获得菌株均采集自上述美国白蛾化蛹场所。因此,综合我国长江下游地区的气候特点及美国白蛾生物学学习性,采用昆虫病原真菌防治美国白蛾在该地区将具有很好的应用前景。

本研究成功筛选获得了生物学性状良好且对美国白蛾高毒力的球孢白僵菌菌株。后续我们将针对昆虫病原真菌防治美国白蛾的应用策略与剂型等开展相关研究。例如,利用美国白蛾下树化蛹的习性,可以借鉴无纺布菌条防治天牛的方法(Dubois et

al., 2004; Shanley et al., 2009),尝试采用无纺布菌条诱集美国白蛾老熟幼虫,在局部形成侵染源,并对控制效果进行追踪;积极开展昆虫病原真菌相关剂型(如悬乳剂和油剂等)以及飞机喷施配套技术等研究等。

参考文献 (References)

- Bai PH, Bai YC, Feng YR, Liu BS, 2015. Pathogenicity and field application of different strains of *Beauveria bassiana* on larvae of *Hyphantria cunea* Drury. *Journal of Tianjin Normal University (Natural Science Edition)*, 35(3): 112-115. [白鹏华, 白义川, 冯友仁, 刘宝生, 2015. 白僵菌不同菌株对美国白蛾幼虫的致病力及田间应用研究. 天津师范大学学报(自然科学版), 35(3): 112-115]
- Batta YA, 2007. Biocontrol of almond bark beetle (*Scolytus amygdali* Geurin-Meneville, Coleoptera: Scolytidae) using *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Journal of Applied Microbiology*, 103: 1406-1414.
- Dolinski C, Lacey LA, 2007. Microbial control of arthropod pests of tropical tree fruits. *Neotrop. Entomol.*, 36(2): 161-179.
- Dubois T, Li ZZ, Hu JF, Hajek AE, 2004. Efficacy of fiber bands impregnated with *Beauveria brongniartii* cultures against the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae). *Biol. Control*, 31: 320-328.
- Erler F, Ates AO, 2015. Potential of two entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Coleoptera: Scarabaeidae), as biological control agents against the June beetle. *J. Insect Sci.*, 15(1): 1-6.
- Guo ZF, Shao HB, Liu HL, Bi YG, Su LY, Wang XL, 2010. Study on the biological characteristic of *Beauveria bassiana* Bb11. *Hebei Journal of Forestry and Orchard Research*, 25(1): 57-60, 75. [国志峰, 邵洪波, 刘洪亮, 毕拥国, 苏丽艳, 王学良, 2010. 球孢白僵菌 Bb11 菌株生物学特性研究. 河北林果研究, 25(1): 57-60, 75]
- Hamiduzzaman MM, Sinia A, Guzman-Novoa E, Goodwin PH, 2012. Entomopathogenic fungi as potential biocontrol agents of the ectoparasitic mite, *Varroa destructor*, and their effect on the immune response of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Invertebr. Pathol.*, 111: 237-243.
- Hussain A, Rizwan-ul-Haq M, Al-Ayedh H, Al-Jabr AM, 2014. Mycoinsecticides: potential and future perspective. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 6: 45-53.
- Ji R, Xie BY, Li XH, Gao ZX, Li DM, 2003. Research progress on the invasive species, *Hyphantria cunea*. *Entomological Knowledge*, 40(1): 13-18. [季荣, 谢宝瑜, 李欣海, 高增祥, 李典谟, 2003. 外来入侵种——美国白蛾的研究进展. 昆虫知识, 40(1): 13-18].
- Liu BS, Gu XS, Xu JY, Hu X, Sun SQ, Bai YC, 2011. Biological characteristics and pathogenicity of *Beauveria bassiana* Bb08-12 to *Hyphantria cunea* larvae. *Plant Protection*, 37(4): 146-149. [刘

- 宝生, 谷希树, 许静杨, 胡霞, 孙淑琴, 白义川, 2011. 白僵菌 Bb08-12 菌株生物学研究及其对美国白蛾的致病性. 植物保护, 37(4): 146 - 149]
- Liu HP, Bauer LS, 2008. Microbial control of emerald ash borer, *Agrilus planipennis* (Coleoptera; Buprestidae) with *Beauveria bassiana* strain GHA: greenhouse and field trials. *Biol. Control*, 45: 124 - 132.
- Liu YJ, Zhang LW, He YQ, Wang B, Ding DG, Li ZZ, 2008. Screening of high virulent strains of *Beauveria bassiana* against a dangerous forest cerambycid beetle, *Aphrodisium sauteri* (Coleoptera; Cerambycidae). *Acta Entomologica Sinica*, 51(2): 143 - 149. [刘玉军, 张龙娃, 何亚琼, 王滨, 丁德贵, 李增智, 2008. 栎旋木柄天牛高毒力球孢白僵菌菌株的筛选. 昆虫学报, 51(2): 143 - 149]
- Liu YQ, Bi YG, Niu YY, Wang XH, Yi HY, Li M, Wang W, Li J, Xu XW, 2013. The screening and field application of highly pathogenic *Beauveria bassiana* of *Hyphantria cunea*. *Hebei Journal of Forestry and Orchard Research*, 28(2): 157 - 160. [刘永清, 毕拥国, 牛亚燕, 王晓虎, 伊宏岩, 李梅, 王玮, 李晋, 徐小伟, 2013. 美国白蛾高致病性白僵菌的筛选及田间应用. 河北林果研究, 28(2): 157 - 160]
- Pilz C, Wegensteiner R, Keller S, 2007. Selection of entomopathogenic fungi for the control of the western corn rootworm *Diabrotica virgifera virgifera*. *J. Appl. Entomol.*, 131(6): 426 - 431.
- Pu ZL, Li ZZ, 1996. Insect Mycology. Anhui Publishing House of Science and Technology, Hefei. 432 - 435. [蒲蛰龙, 李增智, 1996. 昆虫真菌学. 合肥: 安徽科技出版社. 432 - 435]
- Qin FQ, Yan GZ, He W, Wang JL, Tao WQ, 2012. Elementary study on control of *Hyphantria cunea* by *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 40(2): 140 - 145. [覃丰全, 闫国增, 贺伟, 王金利, 陶万强, 2012. 用球孢白僵菌和粉拟青霉防治美国白蛾的研究. 山西农业科学, 40(2): 140 - 145]
- Shah PA, Pell JK, 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61: 413 - 423.
- Shanley RP, Keena M, Wheeler MM, Leland J, Hajek AE, 2009. Evaluating the virulence and longevity of non-woven fiber bands impregnated with *Metarhizium anisopliae* against the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae). *Biol. Control*, 50: 94 - 102.
- Vu VH, Hong SI, Kim K, 2007. Selection of entomopathogenic fungi for aphid control. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104(6): 498 - 505.
- Wang L, 2011. Effect of different condition on mycelium growth of a *Beauveria bassiana* strain and its pathogenicity against *Hyphantria cunea* larvae. *Hebei Huagong*, 34(12): 16 - 19. [王伦, 2011. 不同生长条件下球孢白僵菌菌株的生长状况及对美国白蛾幼虫的致病力研究. 河北化工, 34(12): 16 - 19]
- Yang ZQ, Zhang YA, 2007. Researches on techniques for biocontrol of the fall webworm, *Hyphantria cunea*, a severe invasive insect pest to China. *Chinese Bulletin of Entomology*, 44(4): 465 - 471, 622. [杨忠岐, 张永安, 2007. 重大外来入侵害虫——美国白蛾生物防治技术研究. 昆虫知识, 44(4): 465 - 471, 622]

(责任编辑: 赵利辉)