



赵建伟, 丁雪玲, 郑宇, 赵金凤, 姚凤奎, 卢学松, 何玉仙. 草地贪夜蛾高致病力绿僵菌菌株的筛选与鉴定 [J]. 环境昆虫学报, 2023, 45 (4): 1111–1118.

草地贪夜蛾高致病力绿僵菌菌株的筛选与鉴定

赵建伟^{1*}, 丁雪玲^{1*}, 郑宇¹, 赵金凤², 姚凤奎¹, 卢学松¹, 何玉仙^{1**}

(1. 福建省农业科学院植物保护研究所, 福建省作物有害生物监测与治理重点实验室,

福建省作物有害生物绿色防控工程研究中心, 福州 350013; 2. 福建农林大学植物保护学院, 福州 350002)

摘要: 为获取对草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 具有高致病力的生防真菌, 从福建省不同地区分离得到 8 株寄主为鳞翅目和半翅目幼虫僵虫的绿僵菌 *Metarhizium*, 采用浸渍法测定了其草地贪夜蛾 2 龄幼虫和蛹的致病力, 并根据形态学和分子生物学方法对高致病力菌株进行种类鉴定。结果表明, 8 株绿僵菌菌株对草地贪夜蛾 2 龄幼虫和蛹均表现出不同程度的致病力, 其中菌株 FJMR2 和 FJXY7 表现出较强的致病力。在 5×10^7 个/mL 孢子浓度下, FJMR2 和 FJXY7 对草地贪夜蛾 2 龄幼虫的致死率分别为 88.76% 和 82.13%, 对蛹的致死率分别为 86.57% 和 84.00%; 对草地贪夜蛾 2 龄幼虫的 LT_{50} 分别为 4.81 d 和 4.93 d, 对蛹的 LT_{50} 分别为 4.94 d 和 4.83 d。经鉴定菌株 FJMR2 和 FJXY7 均为莱氏绿僵菌 *Metarhizium rileyi*。本研究获得 2 株对草地贪夜蛾 2 龄幼虫和蛹具有高致病力的莱氏绿僵菌菌株, 在草地贪夜蛾的生物防治中具有较大应用潜力。

关键词: 草地贪夜蛾; 绿僵菌; 致病力; 种类鉴定

中图分类号: Q968.1; S433; S476

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2023) 04-1111-08

Screening and identification of highly pathogenic strains of *Metarhizium* against *Spodoptera frugiperda*

ZHAO Jian-Wei^{1*}, DING Xue-Ling^{1*}, ZHENG Yu¹, ZHAO Jin-Feng², YAO Feng-Luan¹, LU Xue-Song¹, HE Yu-Xian^{1**} (1. Institute of Plant Protection, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fujian Key Laboratory for Monitoring and Integrated Management of Crop Pests, Fujian Engineering Research Center for Green Pest Management, Fuzhou 350013, China; 2. College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Virulence of eight *Metarhizium* strains as their hosts isolated from the larvae of Lepidoptera and Hemiptera was evaluated against the 2nd instar larvae and pupae of *Spodoptera frugiperda* by using dipping method, and the strains with strong virulence were identified according to morphological and molecular biological methods. The results indicated that the eight isolates showed different degrees of pathogenicity to the 2nd instar larvae and pupae of *S. frugiperda*, among which strain FJMR2 and FJXY7 showed strong virulence. When the concentration of strain FJMR2 and FJXY7 reached 5×10^7 spores/mL, the corrected mortality to the 2nd instar larvae of *S. frugiperda* were 88.76% and 82.13% respectively, and the corrected mortality to pupae were 86.57% and 84.00% respectively; LT_{50} values of strain FJMR2 and

基金项目: 福建省属公益类科研院所基本科研专项 (2020R1024009); 福建省自然科学基金 (2021J01477); 福建省科技厅引导性项目 (2020N0026); 福建省农科院创新团队项目 (CXTD2021027); “5511” 协同创新工程 (XTCXGC2021011, 2021017)

* 共同第一作者: 赵建伟, 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向为农业昆虫与害虫防治, E-mail: 58291012@qq.com; 丁雪玲, 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向为农业害虫与生物防治, E-mail: xue95711@163.com

** 通讯作者 Author for correspondence: 何玉仙, 男, 博士, 研究员, 研究方向为农业昆虫与害虫防治, E-mail: yuxianhe_faas@sina.cn

收稿日期 Received: 2022-04-07; 接受日期 Accepted: 2022-12-15

FJXY7 were 4.81 and 4.93 d to the 2nd instar larvae, and 4.94 and 4.83 d to the pupae, respectively. The strain FJMR2 and FJXY7 were identified as *Metarhizium rileyi* based on morphological characteristics and rDNA ITS sequence analysis. In this study, two strains of *M. rileyi* with strong virulence to the 2nd instar larvae and pupae of *S. frugiperda* were successfully screened, which showed great potential for the biological control of *S. frugiperda*.

Key words: *Spodoptera frugiperda*; *Metarhizium*; pathogenicity; species identification

草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 起源于美洲, 对农业生产危害极大, 被联合国粮农组织列为全球重大迁飞性农业害虫之一 (Nagoshi *et al.*, 2017; Gui *et al.*, 2020), 可危害玉米、高粱、大豆等 200 多种重要农作物 (Harrison *et al.*, 2019; 彭国雄等, 2019)。草地贪夜蛾于 2019 年初入侵我国云南地区, 现已扩散至全国大部分地区, 给我国农业及粮食安全生产造成严重威胁 (潘兴鲁等, 2020; 占军平等, 2020)。福建地处亚热带, 气候适宜常年种植玉米, 为草地贪夜蛾越冬提供了良好的寄主条件, 是草地贪夜蛾周年繁殖区, 防控任务艰巨 (邱良妙等, 2020)。

针对草地贪夜蛾在我国的迁飞路径和危害特点, 国内植保工作者已提出多种监测防治手段并提出了杀虫剂田间应用策略 (刘妤玲等, 2019), 但过度依赖农药可能导致草地贪夜蛾产生抗药性问题。在草地贪夜蛾的起源地美国、巴西等国家, 由于长期依靠化学防治, 导致其对传统杀虫剂产生了高水平抗性 (Al-Sarar *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2020)。因此, 生物防治相关方法也已被提出, 如发掘和利用昆虫病原真菌 (徐毓笛等, 2020)、捕食性天敌 (孙贝贝等, 2020)、寄生性天敌 (汤印等, 2020) 等生物资源进行草地贪夜蛾防治。其中, 利用昆虫病原微生物实施“以菌治虫”具有低毒、低残留、无污染、不易产生抗药性等优点, 是害虫生物防治的关键措施, 也是害虫绿色防控体系发展的趋势 (宋晓兵等, 2016)。

绿僵菌作为一类重要而常见的虫生真菌, 可寄生多种害虫, 在农、林及卫生害虫的防治中应用广泛 (Donald and Dymond, 2004; 张亚波等, 2020)。国外在利用绿僵菌防治草地贪夜蛾方面已有较多报道, 墨西哥、巴西等国家很多地区的玉米种植区内均发现大量被莱氏绿僵菌感染的草地贪夜蛾幼虫 (Ruiz-Nájera *et al.*, 2013; Ordóñez-García *et al.*, 2015); Akutse 等 (2019) 测定了多种昆虫病原真菌对草地贪夜蛾幼虫的毒力, 其中

金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 对 2 龄幼虫的致死率低于 10%。鉴于草地贪夜蛾在我国的入侵时间较短, 国内关于绿僵菌防治草地贪夜蛾的研究刚刚起步。彭国雄等 (2019) 在室内条件下测定了金龟子绿僵菌 CQMa421 对草地贪夜蛾不同龄期幼虫、蛹、成虫和卵的杀虫活性, 发现该菌株对草地贪夜蛾低龄幼虫具有杀虫活性并引起蛹黑化。2019 年 7~8 月, 郑亚强等 (2019) 在云南省曲靖市玉米田调查发现, 田间草地贪夜蛾的莱氏绿僵菌感染率在 2.52%~29.83% 之间; 雷妍圆等 (2020) 从广州市玉米田染菌草地贪夜蛾幼虫上获得一株莱氏绿僵菌, 高浓度孢子悬浮液处理下草地贪夜蛾 2 龄幼虫的死亡率达 100%。本研究从福建省不同地区收集罹病草地贪夜蛾幼虫僵虫以及其他鳞翅目和半翅目幼虫僵虫, 对病原真菌进行常规分离及产孢培养, 采用浸渍法测试其对草地贪夜蛾 2 龄幼虫和蛹的致病力, 并对高致病力菌株进行鉴定, 以期对草地贪夜蛾的生物防治提供优良菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株: 采自福建省三明永安、漳州长泰、龙岩上杭、南平建瓯、莆田仙游、福州闽侯和永泰地区等田间罹病的草地贪夜蛾幼虫僵虫以及其他罹病鳞翅目和半翅目幼虫僵虫, 在超净台内挑取带菌虫体少许孢子, 采用划线法接种于萨氏麦芽糖琼脂酵母 (SMAY) 培养基 (蛋白胨 10 g、麦芽糖 40 g、酵母浸粉 2 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 L), 置于光照培养箱 (温度 $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 相对湿度 $70\% \pm 5\%$, 光周期 L:D = 14 h:10 h) 中培养。6~8 d 后挑取孢子转接到新的 SMAY 培养基中进行单孢培养, 10~15 d 后刮取分生孢子置于高压灭菌处理的 30% 甘油中, 震荡混匀后于 -80°C 冰箱贮存备用。供试菌株详细信息见表 1。

供试虫源: 供试草地贪夜蛾于 2019 年 6 月采

自福建省建瓯市东峰镇玉米地, 经室内人工饲料连续饲养的实验室种群, 室内饲养条件为温度 $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 $60\% \sim 70\%$ 、光周期 $L:D = 14\text{ h}$: 10 h 。选取 2 龄幼虫和 1 日龄蛹进行致病力测定。

人工饲料: 草地贪夜蛾人工饲料参考李子园等 (2019) 方法配制。

表 1 供试绿僵菌菌株基本信息

Table 1 Basic information of *Metarhizium* strains used in the experiments

菌株编号 Isolate number	采集地点 Origin	寄主 Host	采集年份 Collection year
FJMR1	三明永安 Yong'an, Sanming	草地贪夜蛾 <i>Spodoptera frugiperda</i>	2019
FJMR2	漳州长泰 Changtai, Zhangzhou	草地贪夜蛾 <i>Spodoptera frugiperda</i>	2019
FJXY3	莆田仙游 Xianyou, Putian	半翅目 Hemiptera	2019
FJMH4	福州闽侯 Minhou, Fuzhou	草地贪夜蛾 <i>Spodoptera frugiperda</i>	2020
FJLY5	龙岩上杭 Shanghang, Longyan	草地贪夜蛾 <i>Spodoptera frugiperda</i>	2020
FJYT6	福州永泰 Yongtai, Fuzhou	鳞翅目 Lepidoptera	2020
FJXY7	莆田仙游 Xianyou, Putian	草地贪夜蛾 <i>Spodoptera frugiperda</i>	2021
FJNP8	南平建瓯 Jian'ou, Nanping	草地贪夜蛾 <i>Spodoptera frugiperda</i>	2021

1.2 孢子悬浮液的制备

将供试菌株接种于 SMAY 固体培养基, 置于光照培养箱 (温度 $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 $70\% \pm 5\%$, 光周期 $L:D = 14\text{ h}:10\text{ h}$) 中培养 15 d, 收集孢子, 加入无菌 0.05% Tween-80 水溶液, 充分震荡后用 6 层无菌纱布滤掉菌丝体获得孢子悬浮液, 采用血球计数板计数, 最终将孢子浓度调整为 5×10^7 个/mL 备用。

1.3 菌株对草地贪夜蛾 2 龄幼虫的致死率测定

挑取大小一致、健康的草地贪夜蛾 2 龄幼虫在浓度为 5×10^7 个/mL 的供试菌株孢子悬浮液中浸渍 5 s 后取出晾干, 然后将其移置人工气候箱内 (温度 $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 $65\% \pm 5\%$) 用塑料养虫盒 (直径为 3 cm, 高为 3 cm) 单头饲养, 养虫盒内放入人工饲料供其取食。设 3 次重复, 每重复 20 头幼虫, 以 0.05% Tween-80 无菌水处理的 2 龄幼虫为对照。每日定期记录试虫的死亡数量, 持续观察 8 d。死亡试虫及时挑出保湿培养, 若体表长出白色菌丝并产绿色孢子, 则视为染菌死亡。

1.4 菌株对草地贪夜蛾蛹的致死率测定

选取大小一致的 1 日龄蛹, 放入配制好的浓度为 5×10^7 个/mL 的供试菌株孢子悬浮液浸渍 5 s 后取出晾干, 然后将其移置人工气候箱内 (温度 $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 $65\% \pm 5\%$) 用塑料养虫盒 (直径为 6 cm, 高为 5 cm) 饲养, 养虫盒内放入棉球保湿, 每个养虫盒中放入 5 头蛹。设 3 次重

复, 每重复 20 头蛹, 以 0.05% Tween-80 无菌水处理的草地贪夜蛾蛹作为对照。每日定期记录蛹的死亡情况 (蛹体多次触碰均无反应则视为死亡), 持续观察 8 d。死亡蛹体及时挑出保湿培养, 若体表长出白色菌丝并产绿色孢子, 则视为染菌死亡。

1.5 菌株鉴定

菌株形态学观察: 将高致病力菌株 FJMR2 和 FJXY7 接种于 SMAY 培养基, 于温度 $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 $70\% \pm 5\%$ 、光周期 $L:D = 14\text{ h}:10\text{ h}$ 的人工气候箱中培养 7 d, 记录菌落培养特征, 并在光学显微镜下观察菌丝和分生孢子形态以及产孢结构。

分子鉴定: 提取纯化菌株 FJMR2 和 FJXY7 的基因组 DNA, 利用真菌通用引物 IT1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 对菌株 rDNA-ITS 序列进行普通 PCR 扩增。50 μL PCR 反应体系: DNA 模板 2 μL (20 ng/ μL), 上、下游引物各 2 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), 2 $\times$ EsTaq PCR Master Mix 25 μL , ddH₂O 补足至 50 μL 。反应条件: 94°C 预变性 5 min; 94°C 40 s, 56°C 30 s, 72°C 30 s, 35 个循环; 72°C 延伸 5 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。测序结果在 GenBank 基因数据库中比对后选择相近序列, 采用 MEGA 7.0 软件的邻接法重复 1 000 次构建系统发育树。

1.6 统计分析

试验数据通过 Excel 2013 和 SPSS 17.0 软件进行统计分析,采用 Duncan 氏新复极差法检验,分析比较不同菌株间的致病力差异,并利用 Probit 方法计算半数致死时间 (LT_{50})。

死亡率 (%) = 死虫数 / 试虫总数 $\times 100$ 。

校正死亡率 (%) = (处理组死亡率 - 对照组死亡率) / (100 - 对照组死亡率) $\times 100$ 。

2 结果与分析

2.1 供试绿僵菌菌株对草地贪夜蛾 2 龄幼虫的致病力

用 5×10^7 个/mL 孢子浓度的悬浮液处理 8 d

后,8 株绿僵菌菌株对草地贪夜蛾 2 龄幼虫的致病力差异显著,其中菌株 FJMR2 和 FJXY7 对草地贪夜蛾 2 龄幼虫的致死率最高,分别为 88.76% 和 82.13%;其次为菌株 FJNP8 和 FJMR1,致死率分别为 77.78% 和 76.19%;菌株 FJMH4、FJYT6 和 FJLY5 的致死率在 52.33% ~ 60.70% 之间;菌株 FJXY3 的致死率最低,仅为 28.25%。菌株 FJMR2 和 FJXY7 对草地贪夜蛾 2 龄幼虫的致死速率最快,半数致死时间 (LT_{50}) 分别为 4.81 d 和 4.93 d;其次为菌株 FJNP8 和 FJMR1, LT_{50} 分别为 5.37 d 和 5.53 d;菌株 FJYT6、FJLY5 和 FJMH4 的 LT_{50} 在 6.94 d ~ 7.14 d 之间;菌株 FJXY3 的致死率低于 50%,故无法计算 LT_{50} (表 2)。

表 2 8 株绿僵菌菌株对草地贪夜蛾 2 龄幼虫的毒力测定

Table 2 Toxicity test of eight *Metarhizium* isolates to the 2nd instar larvae of *Spodoptera frugiperda*

菌株 Strains	校正死亡率 (%) ^① Corrected mortality	回归方程 Rgression equation	LT_{50} (95% 置信区间) (d) ^② 95% Confidence interval	卡方检验 χ^2
FJMR1	76.19 $\pm$ 3.83 b	$y = 0.368x - 2.034$	5.53 (4.88 ~ 6.05) ab	5.26
FJMR2	88.76 $\pm$ 2.13 a	$y = 0.502x - 2.475$	4.81 (4.32 ~ 5.36) a	5.04
FJXY3	28.25 $\pm$ 3.54 d	—	—	—
FJMH4	60.70 $\pm$ 4.40 c	$y = 0.517x - 3.694$	7.14 (6.72 ~ 7.73) c	4.69
FJLY5	52.33 $\pm$ 4.79 c	$y = 0.360x - 2.582$	7.10 (6.61 ~ 8.12) c	4.22
FJYT6	55.54 $\pm$ 2.78 c	$y = 0.365x - 2.644$	6.94 (6.48 ~ 7.09) c	4.24
FJXY7	82.13 $\pm$ 2.22 ab	$y = 0.599x - 2.953$	4.93 (4.61 ~ 5.24) a	4.70
FJNP8	77.78 $\pm$ 3.07 b	$y = 0.573x - 3.089$	5.37 (5.06 ~ 5.75) ab	3.08

注: ①: 表中校正死亡率为平均值 $\pm$ 标准误; 同列数据后不同字母表示差异显著 (Duncan 氏新复极差法检验, $P < 0.05$); “—” 表示校正死亡率低于 50%, 无法估算 LT_{50} 。②: 置信区间不重叠, 表示差异显著。下同。Note: ①: The corrected mortality rates in the table were mean value $\pm$ SE; different letters in the same column indicated significant difference at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test, respectively; “—” represented that corrected mortality rate was less than 50%, LT_{50} value cannot be estimated. ②: The confidence intervals do not overlap, indicated significant differences. The same below.

2.2 供试绿僵菌菌株对草地贪夜蛾蛹的致病力

用 5×10^7 个/mL 孢子浓度的悬浮液处理 8 d 后,8 株绿僵菌菌株对草地贪夜蛾蛹的致病力差异显著,其中菌株 FJMR2 和 FJXY7 对蛹的致死率最高,分别为 86.57% 和 84.00%;其次为菌株 FJNP8、FJMR1 和 FJMH4,致死率在 72.74% ~ 75.39% 之间;菌株 FJLY5 的致死率为 56.55%;菌株 FJXY3 和 FJYT6 的致死率均低于 50%。菌株 FJMR1、FJMR2、FJMH4 和 FJXY7 对蛹的半数致死时间 (LT_{50}) 为 4.83 ~ 5.86 d, 差异不显著;菌

株 FJLY5 和 FJNP8 对蛹的 LT_{50} 分别为 6.63 d 和 6.29 d;菌株 FJXY3 和 FJYT6 对蛹的致死率均低于 50%, 故无法计算 LT_{50} (表 3)。

总体上,菌株 FJMR2 和 FJXY7 对草地贪夜蛾 2 龄幼虫和蛹的致死率最高、半数致死时间最短。

2.3 菌株 FJMR2 和 FJXY7 的种类鉴定

菌株 FJMR2 和 FJXY7 在 SMAY 培养基上的菌落形态相似。培养 7 d 后,菌落直径 6 ~ 9 mm,质地短绒状凸起,正面乳白色,反面土黄色,无分泌物;菌丝表面光滑透明,具分隔,直径 1.1 ~

4.2 μm; 分生孢子梗着生于气生菌丝, 圆柱形, 近基部明显膨大, 大小 2.5 ~ 5.5 × 1.5 ~ 3.0 μm, 瓶梗呈轮生状, 每轮 3 ~ 5 个; 分生孢子链生, 卵圆形或椭圆形, 大小 2.5 ~ 4.0 × 1.5 ~ 2.5 μm, 表面光滑 (图 1-C)。初步鉴定菌株 FJMR2 和 FJXY7 为莱氏绿僵菌 *Metarhizium rileyi*。

表 3 8 株绿僵菌菌株对草地贪夜蛾蛹的毒力测定
Table 3 Toxicity test of eight *Metarhizium* isolates to *Spodoptera frugiperda* pupae

菌株 Strains	校正死亡率 (%) Correctde mortality	回归方程 Rgression equation equation	LT ₅₀ (95% 置信区间) (d) 95% Confidence interval	卡方检验 χ ²
FJMR1	75.16 ± 1.01 bc	y = 0.401x - 2.241	5.59 (4.82 ~ 6.19) ab	3.74
FJMR2	86.57 ± 2.80 a	y = 0.487x - 2.473	4.94 (4.30 ~ 5.42) a	3.02
FJXY3	37.78 ± 2.22 e	—	—	—
FJMH4	72.74 ± 1.03 c	y = 0.367x - 1.977	5.86 (5.11 ~ 6.53) ab	2.73
FJLY5	56.55 ± 3.62 d	y = 0.326x - 2.161	6.63 (5.85 ~ 7.84) c	4.51
FJYT6	41.67 ± 4.32 d	—	—	—
FJXY7	84.00 ± 1.04 ab	y = 0.413x - 1.994	4.83 (3.82 ~ 5.61) a	3.95
FJNP8	75.39 ± 2.37 c	y = 0.626x - 3.989	6.29 (5.96 ~ 6.81) c	4.61

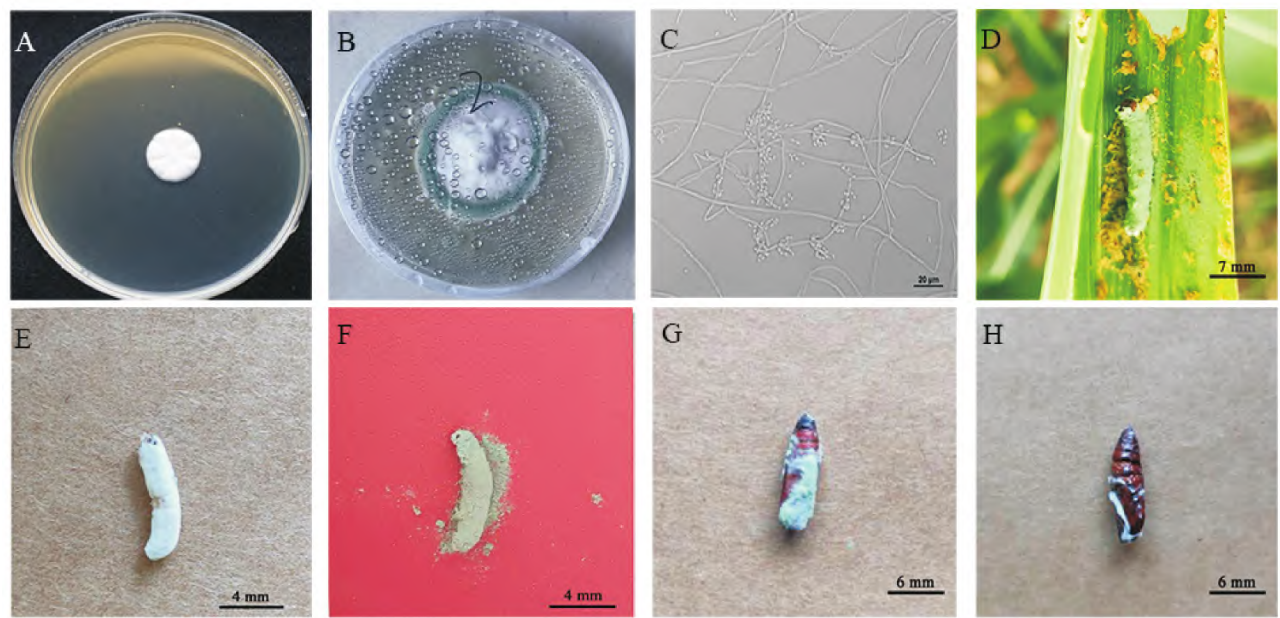


图 1 莱氏绿僵菌形态特征及草地贪夜蛾 2 龄幼虫和蛹感染莱氏绿僵菌的症状 (以 FJMR2 为例)

Fig. 1 Morphological characteristics of *Metarhizium rileyi* and symptoms of infected *Spodoptera frugiperda*

external symptoms of larvae, pupa of *Spodoptera frugiperda* after infection *Metarhizium rileyi* (Take FJMR2 as an example)

注: A, 菌株生长初期; B, 菌株生长后期; C, 分生孢子和菌丝形态; D, 田间被绿僵菌感染的僵虫; E, 2 龄幼虫染病初期; F, 2 龄幼虫染病后期; G, 蛹染病后期; H, 蛹染病前期。Note: A, Initial stage of colony growth; B, Late stage of colony growth; C, Mycelia and branched conidiophores; D, Symptoms of *S. frugiperda* infected by *M. rileyi* in field; E, Initial stage of the 2nd instar larvae infected by *M. rileyi*; F, Late stage of the 2nd instar larvae infected by *M. rileyi*; G, Late stage of the pupae infected by *M. rileyi*; H, Initial stage of the pupae infected by *M. rileyi*.

以 ITS1 和 ITS4 为引物, 从菌株 FJMR2 和 FJXY7 基因组 DNA 分别扩增出 1 条约 550 bp 的序列。将获得序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 相似性比对, 发现该 2 株菌株与 *Metarhizium rileyi*

CBS 806.71 (GenBank 登录号 MH872111) 的同源性高达 99.9% 以上, 位于系统发育树最小进化分支, 亲缘关系最近 (图 2)。综合菌株培养特征、

形态特征和分子生物学方法鉴定, 最终确定菌株 FJMR2 和 FJXY7 均为莱氏绿僵菌 *Metarhizium rileyi*。

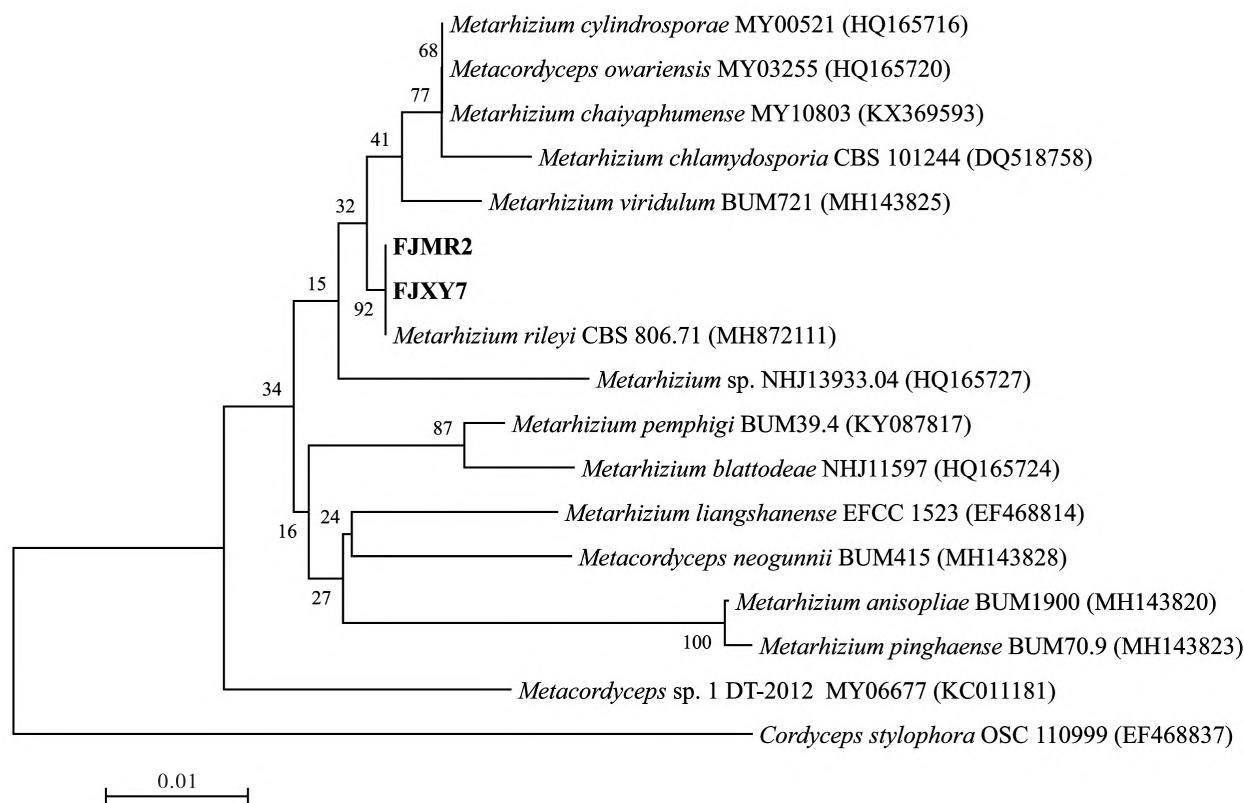


图 2 基于 rDNA-ITS 序列构建的菌株 FJMR2 和 FJXY7 与相关种的系统发育进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the strain FJMR2 and FJXY7 with others related species based on rDNA-ITS sequences

3 结论与讨论

绿僵菌作为重要的害虫生防真菌, 国内外在其物种资源、致病力研究及生防产品开发中已取得重要成果 (蒲蛰龙和李增智, 1996)。鉴于草地贪夜蛾在我国的入侵时间较短, 有关草地贪夜蛾绿僵菌资源的研究主要集中在金龟子绿僵菌和莱氏绿僵菌 (彭国雄等, 2019; 雷妍圆等, 2020)。致病力是评价菌株应用潜力的核心指标, 也是筛选优良菌株的基本依据, 为进一步挖掘防治草地贪夜蛾的优良菌株, 本研究测定了分离自福建省不同地区不同寄主的 8 株绿僵菌菌株对草地贪夜蛾 2 龄幼虫和蛹的致病力, 发现 8 株供试菌株对草地贪夜蛾均有不同程度的致病力, 致死率为 28.25% ~ 88.76%, LT_{50} 为 4.81 ~ 7.14d。从中筛选出 2 株对草地贪夜蛾具较强致病力的菌株 FJMR2 和 FJXY7, 根据菌株形态特征和 rDNA-ITS

序列对比分析, 鉴定 2 株菌株均为莱氏绿僵菌 *Metarhizium rileyi*。

莱氏绿僵菌又名莱氏野村菌 *Nomuraea rileyi*, 可侵染多种鳞翅目害虫, 尤其针对夜蛾科多种为害较大的害虫, 如斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* Fabricius、银纹夜蛾 *Argyrogramma agnata* (Staudinger)、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* Hübner 等, 是一种生防潜力极高的虫生真菌, 在适宜的自然环境下能够引发害虫的病害流行, 显著降低害虫的种群密度 (Srisukchayakul *et al.*, 2005; 罗卿权等, 2018)。周立峰等 (2012) 测定了 5 株莱氏绿僵菌对斜纹夜蛾的毒力, 第 10 天的侵染率在 60% ~ 95% 之间。胥志民等 (2019) 研究发现, 莱氏绿僵菌 Nr 5772 在 5×10^9 个/mL 孢子浓度下对甜菜夜蛾 3、4、5 龄幼虫的 LT_{50} 分别为 4.44 d、4.48 d 和 4.85 d。雷妍圆等 (2020) 用孢子浓度为 1×10^9 个/mL 的莱氏绿僵菌 GZSF-1 处理草地贪夜蛾 2 龄幼虫, 7 d 后幼虫的死亡率达 100%。本

研究结果显示, 莱氏绿僵菌 FJMR2 和 FJXY7 对草地贪夜蛾 2 龄幼虫具有较高致病力, 在 5×10^7 个/mL 孢子浓度下对 2 龄幼虫的致死率均达 80% 以上, 与龙秀珍等 (2021) 的研究报道结果一致。另研究发现, FJMR2 和 FJXY7 能侵染草地贪夜蛾蛹, 在 5×10^7 个/mL 浓度下对蛹的致死率达 84% 以上, 大大降低了蛹的羽化率; 而龙秀珍等 (2021) 研究发现, 莱氏绿僵菌 CDTLJ1 对草地贪夜蛾蛹的致死率仅有 20%, 可能是菌株地理来源不同, 致病性差异较大造成的。土壤具有更好的保湿保温能力, 又可避免紫外线的照射, 为孢子的萌发创造了有利条件, 更适合绿僵菌等杀虫真菌对土壤中栖息害虫的防治 (Ma *et al.*, 2019), 而且在土壤中施加菌剂以防治地下害虫被认为是一种安全有效且可持续的害虫防控措施 (Rogge *et al.*, 2017)。鉴于草地贪夜蛾大部分在土壤中化蛹, 可以考虑在土壤中添加菌剂, 达到对草地贪夜蛾持续控制的目的。

综上所述, 文中筛选到 2 株对草地贪夜蛾 2 龄幼虫及蛹有较高致病力的莱氏绿僵菌 FJMR2 和 FJXY7, 具有研究价值和应用潜力, 但本文研究结果是基于稳定的室内环境条件下取得的, 如何让该菌株在复杂的自然环境中发挥对草地贪夜蛾的持续控制作用仍有待进一步研究。

参考文献 (References)

- Akutse KS, Kimemia JW, 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): 626–634.
- Al-Sarar A, Hall FR, Downer RA. Impact of spray application methodology on the development of resistance to cypermethrin and spinosad by fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) [J]. *Pest Management Science*, 2006, 62 (11): 1023–1031.
- Donald WR, Dymond JSL. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect pathogenic fungi: Mycological aspects [J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2004, 54: 1–70.
- Gui FR, Lan TM, Zhao Y, *et al.* Genomic and transcriptomic analysis unveils population evolution and development of pesticide resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda* [J]. *Protein & Cell*, 2020, 13 (7): 513–531.
- Harrison RD, Thierfelder C, Baudron F, *et al.* Agro-ecological options for fall armyworm (*Spodoptera frugiperda* J. E. Smith) management: Providing low-cost, smallholder friendly solutions to an invasive pest [J]. *Journal of Environmental Management*, 2019, 243: 318–330.
- Lei YY, Wang DS, Xue ZH, *et al.* Identification of a *Metarhizium*

- strain and its pathogenicity to *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Guangzhou area [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2020, 51 (6): 1265–1273. 雷妍圆, 王德森, 薛志洪, 等. 广州地区一株绿僵菌的鉴定及其对草地贪夜蛾的致病力测定 [J]. *南方农业学报*, 2020, 51 (6): 1265–1273]
- Liu YL, Zhang YS, Zhang S, *et al.* Control efficacy of five ultra-low volume liquid insecticides against *Spodoptera frugiperda* in corn field [J]. *Plant Protection*, 2019, 45 (5): 102–105. 刘好玲, 张永生, 张生, 等. 5 种杀虫剂超低容量液剂对玉米田草地贪夜蛾的防治效果 [J]. *植物保护*, 2019, 45 (5): 102–105]
- Li ZY, Dai QX, Kuang ZL, *et al.* Effects of three artificial diets on development and reproduction of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2019, 41 (6): 1147–1154. 李子园, 戴钊萱, 邝昭琅, 等. 3 种人工饲料对草地贪夜蛾生长发育及繁殖力的影响 [J]. *环境昆虫学报*, 2019, 41 (6): 1147–1154]
- Long XZ, Gao XY, Zeng XR, *et al.* Screening of a *Metarhizium rileyi* strain and its virulences to *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Chinese Journal Biological Control*, 2021, 37 (6): 1111–1119. 龙秀珍, 高旭渊, 曾宪儒, 等. 一株莱氏绿僵菌的筛选及其对草地贪夜蛾的毒力 [J]. *中国生物防治学报*, 2021, 37 (6): 1111–1119]
- Luo QQ, Lu GL, Xu Y, *et al.* Identification of pathogenic fungus *Metarhizium rileyi* isolated from lawn grass cutworm *Spodoptera depravata* based on multiple-gene sequence analysis [J]. *Journal of Plant Protection*, 2018, 45 (3): 614–621. 罗卿权, 路广亮, 徐颖, 等. 一株淡剑灰翅夜蛾病原性真菌莱氏绿僵菌的多基因序列鉴定 [J]. *植物保护学报*, 2018, 45 (3): 614–621]
- Ma T, Wang HF, Liang SP, *et al.* Effects of soil-treatment with fungal biopesticides on pupation behaviors, emergence success and fitness of tea geometrid, *Ectropis grisescens* (Lepidoptera: Geometridae) [J]. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 2019, 22 (1): 208–214.
- Nagoshi RN, Fleischer S, Meagher RL, *et al.* Fall armyworm migration across the Lesser Antilles and the potential for genetic exchanges between North and South American populations [J]. *PLoS ONE*, 2017, 12 (3): e0171743.
- Ordóñez-García M, Ríos-Velasco C, Berlanga-Reyes DI, *et al.* Occurrence of natural enemies of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Chihuahua, Mexico [J]. *Florida Entomologist*, 2015, 98 (3): 843–847.
- Pan XL, Dong FS, Rui CH, *et al.* Risk assessments and countermeasures of emergency chemical prevention and control of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) in China [J]. *Plant Protection*, 2020, 46 (6): 117–123. 潘兴鲁, 董丰收, 芮昌辉, 等. 我国草地贪夜蛾应急化学防控风险评估及对策 [J]. *植物保护*, 2020, 46 (6): 117–123]
- Peng GX, Zhang SL, Xia YX. Laboratory efficacy of insecticidal fungi for control of *Spodoptera frugiperda* [J]. *Chinese Journal Biological Control*, 2019, 35 (5): 729–734. 彭国雄, 张淑玲, 夏玉先. 杀虫真菌对草地贪夜蛾不同虫态的室内活性 [J]. *中国生物防治学报*, 2019, 35 (5): 729–734]

- Pu ZL, Li ZZ. Insect Mycology [M]. Hefei: Anhui Publishing House of Science and Technology, 1996: 95–97. 蒲蛰龙, 李增智. 昆虫真菌学 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1996: 95–97]
- Qiu LM, Liu QQ, Tian XH, *et al.* Cold hardiness and overwintering ability of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* populations in Fujian Province [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2020, 57 (6): 1299–1310. 邱良妙, 刘其全, 田新湖等. 福建省草地贪夜蛾种群的耐寒性与越冬能力研究 [J]. *应用昆虫学报*, 2020, 57 (6): 1299–1310]
- Rogge SA, Mayerhofer J, Enkerli J, *et al.* Preventive application of an entomopathogenic fungus in cover crops for wireworm control [J]. *Biocontrol*, 2017, 62 (5): 613–623.
- Ruiz – Nájera RE, Ruiz – Estudillo RA, Sánchez – Yáñez JM, *et al.* Occurrence of entomopathogenic fungi and parasitic nematodes on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae collected in central Chiapas, México [J]. *Florida Entomologist*, 2013, 96 (2): 498–503.
- Song XB, Peng AT, Cheng BP, *et al.* Review of biological controls of *Diaphorina citri* using entomopathogenic fungi [J]. *Journal of Biosafety*, 2016, 25 (4): 255–260. 宋晓兵, 彭埃天, 程保平, 等. 利用虫生真菌生物防治柑橘木虱的研究进展 [J]. *生物安全学报*, 2016, 25 (4): 255–260]
- 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: 273–276.
- Sun BB, Hou ZR, Dong M, *et al.* Functional response of *Orius sauteri* to the 1st – instar larvae of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* [J]. *Journal of Plant Protection*, 2020, 47 (4): 845–851. 孙贝贝, 侯峥嵘, 董民, 等. 东亚小花蝽对草地贪夜蛾 1 龄幼虫的捕食作用 [J]. *植物保护学报*, 2020, 47 (4): 845–851]
- Tang Y, Guo JF, Wang QY, *et al.* Three larval parasitic wasps of *Spodoptera frugiperda* were found in Dehong prefecture of Yunnan Province [J]. *Plant Protection*, 2020, 46 (3): 254–259. 汤印, 郭井菲, 王勤英, 等. 云南省德宏州发现 3 种草地贪夜蛾幼虫寄生蜂 [J]. *植物保护*, 2020, 46 (3): 254–259]
- Xu YD, Wei HS, Shi JW, *et al.* Comparison of virulence of three *Beauveria bassiana* strains against fall armyworm *Spodoptera frugiperda* [J]. *Journal of Plant Protection*, 2020, 47 (4): 867–874. 徐毓笛, 魏红爽, 石嘉伟, 等. 三株球孢白僵菌对草地贪夜蛾的毒力比较 [J]. *植物保护学报*, 2020, 47 (4): 867–874]
- Xu ZM, Bing YC, Li XW, *et al.* Virulence of *Nomuraea rileyi* Nr5772 isolate against *Spodoptera exigua* [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2019, 35 (15): 146–150. 胥志民, 邢玉成, 李学文, 等. 莱氏野村菌 Nr5772 菌株对甜菜夜蛾的毒力研究 [J]. *中国农学通报*, 2019, 35 (15): 146–150]
- Zhan JP, Zhang AM, Deng FK, *et al.* Application and promotion of mamestra brassicae nucleopolyhedrovirus suspension for control of *Spodoptera frugiperda* [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2020, 36 (6): 872–873. 占军平, 张安明, 邓方坤, 等. 甘蓝夜蛾核型多角体病毒悬浮剂防治草地贪夜蛾的应用与推广 [J]. *中国生物防治学报*, 2020, 36 (6): 872–873]
- Zhang BZ, Su X, Zhen CA, *et al.* Silencing of cytochrome P450 in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) by RNA interference enhances susceptibility to chlorantraniliprole [J]. *Journal of Insect Science*, 2020, 20 (3): 1–7.
- Zhang YB, Zhang W, Zhang SK, *et al.* Identification of four entomopathogenic *Metarhizium* strains and their virulence against *Monochamus alternatus* adults [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2020, 56 (1): 103–111. 张亚波, 张威, 张守科, 等. 4 株绿僵菌的鉴定及对松褐天牛成虫致病效果比较 [J]. *林业科学*, 2020, 56 (1): 103–111]
- Zheng YQ, Hu HF, Fu YF, *et al.* Isolation and identification of entomopathogenic fungi *Metarhizium rileyi* isolated from *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) [J]. *Plant Protection*, 2019, 45 (5): 65–70. 郑亚强, 胡惠芬, 付玉飞, 等. 草地贪夜蛾莱氏绿僵菌的分离鉴定 [J]. *植物保护*, 2019, 45 (5): 65–70]
- Zhou LF, Yu SJ, Liu YB, *et al.* Laboratory assessment on virulence of *Nomuraea rileyi* against noctuid larvae [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2012, 28 (1): 47–52. 周立峰, 于士军, 刘元兵, 等. 莱氏野村菌对夜蛾科害虫防治潜力的室内评测 [J]. *中国生物防治学报*, 2012, 28 (1): 47–52]