

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2020.01.002

重庆地区玉米黏虫僵虫体内 虫生真菌的分离鉴定

耿敬可^{1,2,3}, 吴燕燕^{1,2,4}, 顾佑铖^{1,2,4}, 唐运林^{1,2,4},
韦俊宏^{1,2,3,4}, 潘国庆^{1,2,3,4}, 周泽扬^{1,2,4,5}

1. 西南大学 家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400715;
2. 西南大学 微孢子虫感染与防控重庆市重点实验室, 重庆 400715;
3. 西南大学 生物技术学院, 重庆 400715;
4. 西南大学 农业部蚕桑生物学与遗传育种重点实验室, 重庆 400715;
5. 重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 401331

摘要: 玉米黏虫(*Mythimna separata*)是一种常见的鳞翅目害虫,具有暴发性和迁飞性,对农作物危害严重. 虫生真菌是昆虫病原微生物中的最大类群,可以有效地控制自然界中害虫的种群数量. 为了防治玉米黏虫和与玉米黏虫相近的草地贪夜蛾,丰富虫生真菌菌种资源,以采自重庆江津高粱地中的玉米黏虫僵虫为实验材料,运用传统培养方法分离鉴定了 6 株真菌. 经过形态学观察和分子生物学鉴定将这 6 株真菌归类于 3 个属,分别为镰刀菌属(*Fusarium*)、青霉属(*Penicillium*)以及鬼伞属(*Coprinellus*). 虫生真菌能够引发昆虫感染发病,将害虫的种群数量长期控制在较低水平以下,在生物防治方面很有意义. 此次分离纯化得到镰刀菌属(*Fusarium*)和青霉属(*Penicillium*)的真菌均有潜在的杀虫能力,鬼伞属(*Coprinellus*)真菌具有防治线虫的潜力,这些真菌对玉米黏虫和草地贪夜蛾的杀虫效果还有待于进一步的实验研究.

关键词: 玉米黏虫; 虫生真菌; 分离鉴定; 重庆地区; 草地贪夜蛾

中图分类号: Q969.436.5; Q93-331 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-9868(2020)01-0009-07

玉米黏虫(*Mythimna separata*)是一种常见的农业害虫,属鳞翅目、夜蛾科,又名行军虫. 成虫体长 17~20 mm,淡灰褐色或黄褐色,雄蛾体色较深^[1]. 玉米黏虫主要为害玉米、水稻等粮食作物,幼虫期暴食作物叶片,严重时可造成农作物减产甚至绝收^[1-2]. 玉米黏虫在我国多地均有不同程度的发生,且对当地的农作物均造成了不同程度的伤害^[3]. 目前主要采用化学防治措施来防治农业害虫,但频繁使用化学农药会造成农药残留、环境污染以及昆虫抗药性等诸多问题^[4]. 因此,需要一种新的防治策略来解

收稿日期: 2019-12-10

基金项目: 中央高校基本科研业务费团队项目(XDJK2018AA001); 中央高校基本科研业务费面上项目(XDJK2019C010); 家蚕基因组生物学国家重点实验室自设课题(2019-03).

作者简介: 耿敬可(1997—),女,大学本科生,主要从事昆昆虫体内微生物研究.

通信作者: 韦俊宏,博士,讲师; 潘国庆,博士,研究员,博士研究生导师.

决目前遇到的困难。

微生物与植物在漫长的进化过程中逐渐形成了互惠互利的关系^[5]。除了互相提供营养物质以供对方生长外,有些致病微生物,尤其是虫生真菌,能将害虫的种群数量长期控制在较低水平以下^[6]。虫生真菌是昆虫病原微生物的最大类群,据不完全统计,世界上已记载的虫生真菌约 100 属 1 000 多种^[7],而我国已发现的虫生真菌涵盖 40 多个属 400 多个种^[8],包括白僵菌属(*Beauveria*)、绿僵菌属(*Metarhizium* *sorokin*)、青霉属(*Penicillium*)和镰刀菌属(*Fusarium*)等。虫生真菌侵染昆虫的过程主要包括识别寄主、机械破坏、分泌毒素和干扰代谢等,各种因素的共同作用导致寄主昆虫死亡^[8]。利用虫生真菌防治害虫,不仅对环境无污染、不易产生抗性,而且可以持续控制靶标害虫^[9],故利用虫生真菌防治农林害虫已成为害虫控制的一种新趋势。

草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)是一种被联合国粮农组织全球预警的跨国迁飞性农业重大害虫,属鳞翅目、夜蛾科,又名秋黏虫,主要为害玉米、水稻和甘蔗等作物^[10],具有很强的迁飞扩散和暴发取食能力^[11]。草地贪夜蛾自 2019 年 1 月份入侵我国云南后,快速迁飞到长江中下游、黄淮、华东、东北和西北等地^[12],目前已经入侵了 25 个省。2019 年 7 月在江津高粱地中发生了草地贪夜蛾危害,本课题组在采集草地贪夜蛾样本时,发现该块高粱地也同时存在大量玉米黏虫,并发现部分死亡的玉米黏虫僵虫。故推测从玉米黏虫僵虫体内分离获得的虫生真菌对草地贪夜蛾也可能存在一定的杀伤作用,并依此开展了实验研究。

本实验以采自重庆江津高粱地中的玉米黏虫僵虫为实验材料,运用传统培养方法分离纯化真菌,通过形态学观察和分子生物学鉴定等方法确定真菌的分类。希望能够发现对玉米黏虫和草地贪夜蛾有致病力的真菌,为玉米黏虫和草地贪夜蛾的生物防治提供更为丰富的虫生真菌资源。

1 材料及方法

1.1 供试昆虫

玉米黏虫幼虫僵虫两只:采自重庆江津高粱地中,一只僵虫上附有绿色霉状物,一只附有些许白色粉状物。

1.2 供试培养基与主要试剂

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)(1 000 mL:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 16 g);ITS1, ITS4 引物(上海生工生物工程股份有限公司);Dream Taq PCR 酶(Thermofish)。

1.3 玉米黏虫虫生真菌的分离纯化

玉米黏虫僵虫样本的分离纯化工作均在超净工作台中进行。在 PDA 培养基上涂布 20 μ L 氨苄青霉素和 20 μ L 卡那霉素,晾干后备用。将黏虫虫体浸入 75%的乙醇溶液中,消毒 5 s,再用灭菌水漂洗 3 次。用灭菌滤纸吸净水分后,剪开虫体,将其放置于准备好的 PDA 平板上。将 PDA 平板放置于 30 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养,定期观察。待虫体周围长出菌丝后,挑取菌丝转至新的 PDA 平板上。重复 3 次后,挑取单菌落进行分离纯化。

1.4 菌株形态学鉴定

将分离纯化的菌株接种到 PDA 平板中央,置于 30 $^{\circ}$ C 恒温条件下培养,定期观察菌落生长情况,记录其颜色及形态,并且在光学显微镜下观察菌丝及孢子形态,参考真菌鉴定手册^[13],对分离到的菌株进行形态学鉴定。

1.5 ITS 序列鉴定

使用 CTAB 法^[14] 提取菌株的基因组 DNA, 用 NanoDrop ND-2000 仪器测定其浓度, -20 ℃ 保存. 采用真菌通用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行 ITS 序列扩增, 将扩增产物送往上海生工生物工程股份有限公司测序.

反应体系: 模板 DNA 2.5 μL, 引物 ITS1/ITS4 各 1 μL, Dream Taq 酶 12.5 μL, 无菌水补足至 25 μL.
反应程序: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 51 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min.

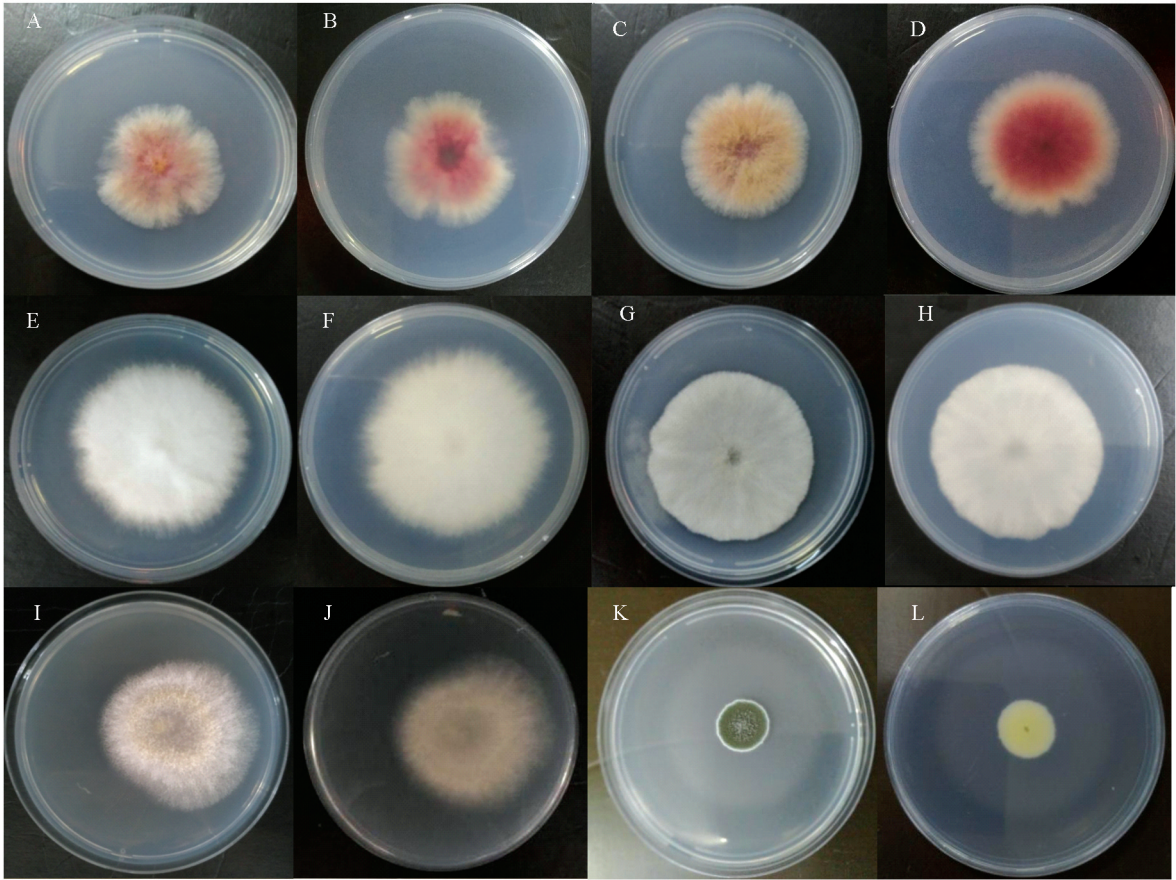
将测序所得基因序列与 GenBank 数据库中保存的基因序列进行比对, 从中选择下载同源性较高的序列, 使用 MEGA5.2 软件, 运用 NJ 法进行 1 000 次步长计算, 构建系统发育进化树.

2 结果与分析

本次实验从玉米黏虫僵虫样本上共分离得到 6 株真菌, 分别编号为: JJ1-1, JJ1-3, JJ1-4, JJ1-5, JJ3-1, N1-1.

2.1 真菌菌株形态学鉴定

各菌株的菌落与细胞形态图见图 1 和图 2.

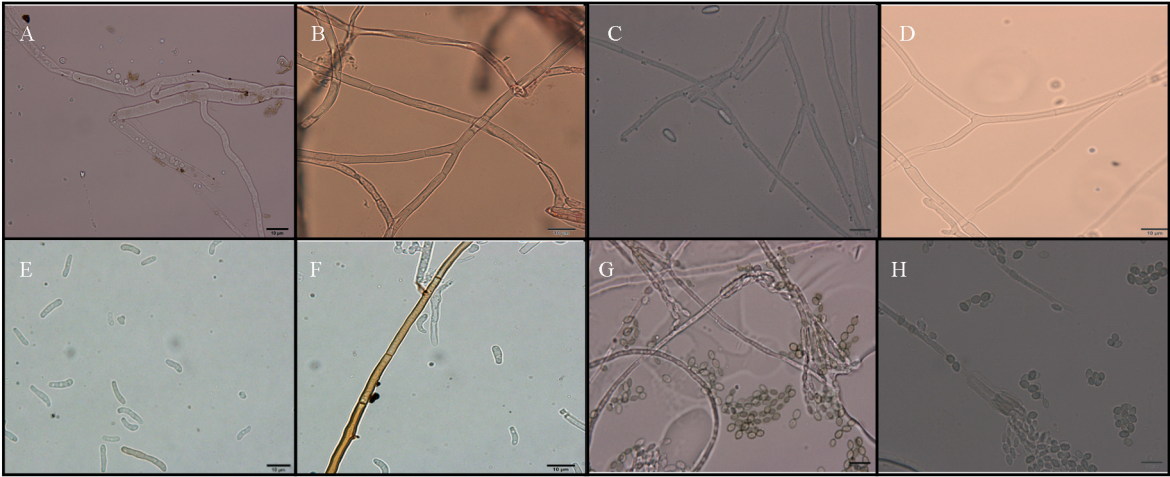


A, B. JJ1-1; C, D. JJ1-4; E, F. N1-1; G, H. JJ1-5; I, J. JJ3-1; K, L. JJ1-3.

图 1 菌落形态图片

1) 菌株 JJ1-1(图 1A 为平板正面, 图 1B 为平板背面), 正面边缘呈白色, 中间呈现黄色和红色, 菌丝发达, 绒毛状; 菌落背面边缘呈白色, 中间呈红色; 菌落较为干燥, 不透明.

- 2) 菌株 JJ1-4(图 1C 为平板正面, 图 1D 为平板背面), 正面边缘呈白色, 中间呈现黄色和红色, 菌丝发达, 绒毛状; 菌落背面边缘呈白色, 中间呈红色; 菌落较为干燥, 不透明.
- 3) 菌株 N1-1(图 1E 为平板正面, 图 1F 为平板背面), 正面和背面均呈白色, 菌丝浓密发达、绒毛状; 菌落较为干燥, 不透明.
- 4) 菌株 JJ1-5(图 1G 为平板正面, 图 1H 为平板背面), 正面和背面均呈白色, 菌丝致密, 绒毛状; 菌落较为干燥, 不透明.
- 5) 菌株 JJ3-1(图 1I 为平板正面, 图 1J 为平板背面), 正面和背面均边缘呈白色, 中心为黄色; 菌落较为干燥, 不透明.
- 6) 菌株 JJ1-3(图 1K 为平板正面, 图 1L 为平板背面), 初期呈白色, 质地紧密且菌丝较短; 孢子呈深绿色, 大量产生、易脱落; 菌落外缘有一圈白色菌丝; 菌落背面呈淡黄色; 菌落较为干燥, 不透明.



A. JJ1-1; B. JJ1-4; C. N1-1; D. JJ1-5; E, F. JJ3-1; G, H. JJ1-3.

图 2 真菌菌丝形态图

- 1) 菌株 JJ1-1(图 2A), 菌丝有隔, 分枝.
- 2) 菌株 JJ1-4(图 2B), 菌丝有隔, 分枝.
- 3) 菌株 N1-1(图 2C), 菌丝有隔, 分枝; 分生孢子呈卵圆形或长柱形.
- 4) 菌株 JJ1-5(图 2D), 菌丝有隔, 分枝.
- 5) 菌株 JJ3-1(图 2E, F), 菌丝有隔; 孢子呈长柱形或短柱形.
- 6) 菌株 JJ1-3(图 2G, H), 分生孢子梗呈扫帚状; 分生孢子呈卵圆形.

2.2 真菌菌株的分子生物学鉴定

将各菌株测序所得序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对, 选取相关序列通过 MEGA 5.2 使用 NJ 进行 1 000 次步长计算, 构建系统发育树. 与形态学结果相结合, 将菌株 JJ1-1, JJ1-4, JJ1-5, N1-1 归类于镰刀菌属(*Fusarium*); JJ1-3 归类于青霉属(*Penicillium*); JJ3-1 归类于鬼伞属(*Coprinellus*).

在基于 rDNA ITS 序列片段构建的系统发育进化树中, 从玉米黏虫僵虫上已分离得到的真菌形成了不同的分支: 菌株 JJ1-1 与 *Fusarium graminearum* (KY466825) 聚为同一分支; JJ1-4 与 *Fusarium graminearum* (MK212898) 聚为同一分支; JJ1-5 和 *Fusarium chlamydosporum* (KF494035) 聚为同一分支; N1-1 和 *Fusarium* sp. (MH550472) 聚为同一分支; JJ1-3 和 *Penicillium oxalicum* (KP868627) 和 *Penicillium oxalicum* (MK281571) 聚为同一分支; JJ3-1 和 *Coprinellus radians* (KP900252) 聚为同一分支. 由此可知, 在此次实验所得的镰刀菌属真菌中, 很有可能 有 3 个镰刀菌种: JJ1-1 和 JJ1-4 更接近于同一个镰刀菌

种 *Fusarium graminearum*, JJ1-5 和 N1-1 分别为另外的两个镰刀菌种. 从玉米黏虫僵虫上已分离得到的真菌的系统发育树见图 3.

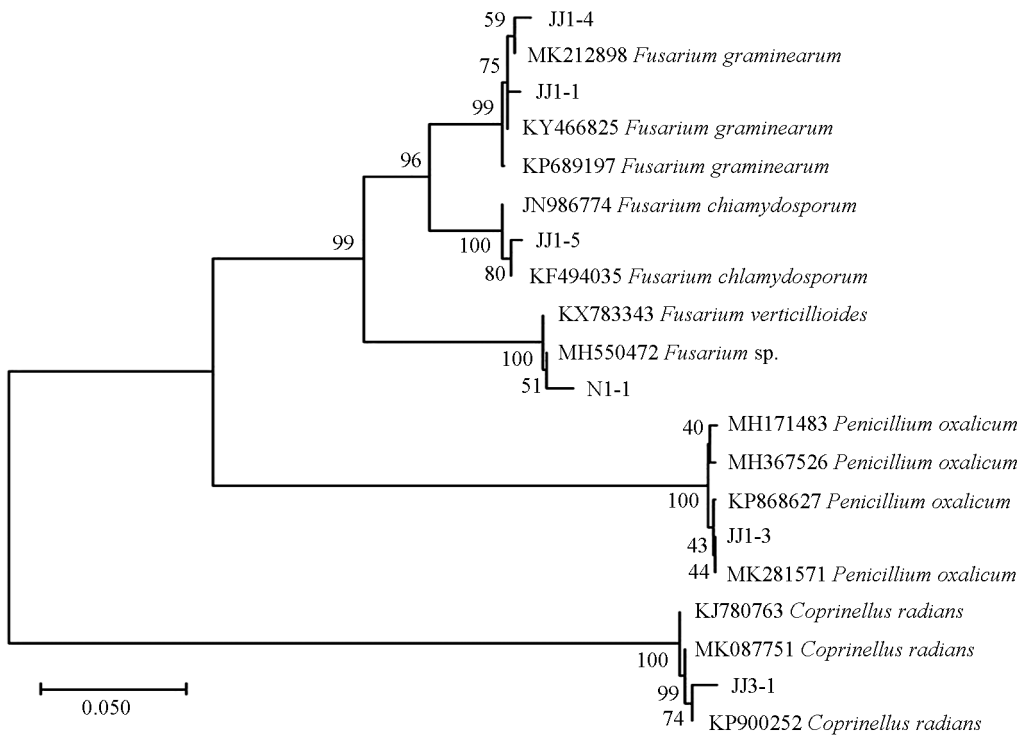


图 3 玉米黏虫僵虫分离的真菌 ITS 序列系统发育分析

3 讨 论

本次实验以重庆江津高粱地中的玉米黏虫僵虫为样本, 共分离得到了 3 个属 6 株真菌, 分别归类于镰刀菌属(*Fusarium*)、青霉属(*Penicillium*)和鬼伞属(*Coprinellus*)。

已有研究报道表明, 虫生镰刀菌(*Fusarium* sp.)可作为昆虫病原菌, 对昆虫起到杀灭作用. 例如, 嗜蚱镰刀菌(*F. coccophilum*)可寄生多种蚱壳虫, 对控制蚱壳虫虫口密度具有重要作用; 木贼镰刀菌(*F. equiseti*)可用于防治菜青虫; 串珠镰刀菌(*F. moniliforme*)可用于棉蚜的田间防治^[15]等. 镰刀菌属(*Fusarium*)的许多真菌可寄生于昆虫, 包括黑蚁成虫、麻天牛成虫、华北蝼蛄若虫、日本菱蝗若虫和种蝇成虫等^[16]. 镰刀菌可以通过产生某些代谢产物杀死根结线虫的卵粒后再定殖于卵, 或影响卵的发育^[17]. 此外, 镰刀菌易产生厚垣孢子, 又为土壤习居菌, 在极端的土壤条件下也能存活定殖, 因此作为根结线虫生防菌具有很大的潜力^[18]. 但是, 镰刀菌属(*Fusarium*)同时也是多种经济作物最重要的病原真菌之一, 属内的多个种均可侵染玉米引起茎基腐病^[19], 其产生的次生代谢毒素对人类和动物均有毒害作用, 甚至可以致癌^[20].

青霉属(*Penicillium*)真菌在世界上广泛分布, 但是关于将青霉属(*Penicillium*)真菌用作生防菌防治害虫的报道却比较少. 孙涛等^[21]在鱼藤属植物内发现了一株内生青霉菌, 研究后发现其代谢产物具有杀灭蚜虫的能力. 也有研究表明, 从青霉属(*Penicillium*)真菌中可以筛选到红青霉素和青霉酸等有明显杀灭昆虫活性的物质^[22]. 同时也发现青霉属(*Penicillium*)真菌可以寄生于多种昆虫, 使其染病甚至死亡, 例如落叶松八齿小蠹成虫、小猿叶甲成虫(鞘翅目)、黑蚁成虫、斑须蝽若虫(半翅目)、棉蚜成虫(同翅目)和印度大蚕蛾等^[22]. 有报道显示: 草酸青霉菌的发酵液对植物寄生线虫有明显的毒杀作用, 不同浓度的发酵液对大豆胞囊线虫 2 龄幼虫均具有毒杀作用, 对卵的孵化也有一定的抑制作用^[23]. 由此可见, 利用青霉属(*Penicillium*)真菌防治农作物病虫害是很有研究价值的. 但是, 青霉属(*Penicillium*)内的多个种也是植物病原菌, 例如可以引起枣果霉烂^[24].

而关于鬼伞属(*Coprinellus*)真菌用作生防菌防治昆虫的报道比较少,大多都是用于防治线虫。研究发现,鬼伞属(*Coprinellus*)真菌的杀线虫活性与杀线虫毒素密切相关,毛头鬼伞(*C. comatus*)含有多种杀线虫毒素,可以捕杀全齿复活线虫和根结线虫^[25]。青岛农业大学的学者^[26]曾将一株辐毛小鬼伞应用于防治小麦禾谷孢囊线虫病害。因此,利用鬼伞属(*Coprinellus*)真菌防治农作物害虫是有一定的潜力的。

虫生真菌的宿主种属特异性较强,不同菌株的宿主谱和毒力的差别也比较大,因此分离鉴定更多的菌株有助于丰富虫生真菌资源,为虫生真菌生防农药的开发提供更多的材料^[27]。鉴于当前很难获得玉米黏虫与草地贪夜蛾的幼虫,本实验中分离到的虫生真菌对玉米黏虫和草地贪夜蛾幼虫的毒力还未能测定,有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] 赵红乾,宋文亮. 陕西省玉米黏虫发生为害和防治技术 [J]. 种子世界, 2015(9): 37-38.
- [2] 全国农业技术推广服务中心. 2019 全国农作物重大病虫害发生趋势预报 [J]. 中国植保导刊, 2019, 39(2): 36-39.
- [3] 刘 杰,曾 娟,姜玉英,等. 2018 年我国玉米重大病虫害发生特点和原因分析 [J]. 中国植保导刊, 2019, 39(2): 43-49.
- [4] 杨爱国,谭育莲,杨昌伟,等. 利用虫生真菌生物防治柑橘木虱的效果研究 [J]. 农业科技与信息, 2019(10): 85-86.
- [5] 孙艺昕. 玉米抗虫内生真菌筛选及抗虫机理初探 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2019.
- [6] 李 月,姜春杰,赵宇鹰,等. 虫生真菌在林业害虫生物防治中的应用 [J]. 吉林农业, 2017(15): 64-65.
- [7] 王记祥,马良进. 虫生真菌在农林害虫生物防治中的应用 [J]. 浙江林学院学报, 2009, 26(2): 286-291.
- [8] 宋晓兵,彭埃天,程保平,等. 一株侵染柑橘木虱的球孢白僵菌的分离及鉴定 [J]. 植物保护, 2017, 43(4): 139-144.
- [9] 练 涛,秦长生,揭育泽,等. 六株虫生真菌的生物学特性及其对油茶象甲的致病力 [J]. 环境昆虫学报, 2019, 41(3): 642-649.
- [10] 唐运林,顾偕铨,吴燕燕,等. 入侵重庆地区的草地贪夜蛾种群生物型鉴定 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2019, 41(7): 1-7.
- [11] 王登杰,任茂琼,姜继红,等. 草地贪夜蛾绿色防控技术研究进展 [J/OL]. 植物保护: 1-12 (2019-11-06) [2019-12-19]. <https://doi.org/10.16688/j.zwbh.2019575>.
- [12] 吴燕燕,耿敬可,徐 思,等. 重庆地区草地贪夜蛾幼虫肠道真菌的分离鉴定 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2019, 41(9): 1-8.
- [13] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海科学技术出版社, 1979.
- [14] ARSENEAU J R, STEEVES R, LAFLAMME M. Modified Low-Salt CTAB Extraction of High-Quality DNA from Contaminant-Rich Tissues [J]. Molecular Ecology Resources, 2017, 17(4): 686-693.
- [15] 叶琪铭. 昆虫天敌——虫生镰刀菌 [J]. 昆虫天敌, 1989, 11(1): 5-9.
- [16] 李文英,张 纯,张仙红,等. 山西虫生真菌资源的研究Ⅲ——虫生镰刀菌的研究 [J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2003, 23(3): 227-229.
- [17] 刘国坤,肖 顺,洪彩凤,等. 镰刀菌对南方根结线虫卵的寄生特性 [J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2006, 35(5): 459-462.
- [18] 段玉玺,曲泽岚,王媛媛,等. 南方根结线虫生防镰刀菌菌株筛选 [J]. 农药, 2010, 49(8): 607-609, 620.
- [19] 孙 静,谢淑娜,刘佳中,等. 河南省玉米茎基部镰刀菌的形态和分子鉴定 [J]. 植物病理学报, 2014, 44(1): 8-16.
- [20] 林镇跃,阙友雄,刘平武,等. 植物致病镰刀菌的研究进展 [J]. 中国糖料, 2014(1): 58-64, 78.
- [21] 孙 涛,孙之潭,胡美英,等. 鱼藤属植物内生青霉菌代谢产物的提取及杀蚜活性分析 [J]. 华南农业大学学报, 2016, 37(1): 46-51.
- [22] 李文英,贺运春,温变英,等. 山西虫生真菌资源的研究(Ⅱ)——虫生青霉菌的研究 [J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2002, 22(4): 285-287.
- [23] 中国农业科学院植物保护研究所. 一株具有杀线虫活性的草酸青霉菌 NBC012、其制备方法及应用: 中国,

CN201610486284. 9 [P]. 2016-08-17.

- [24] 沙娜瓦尔·色买提, 玉山江·买买提, 郭庆元, 等. 枣果霉烂病原鉴定(二)——引起新疆枣果霉烂病的几种青霉菌的分离鉴定 [J]. 新疆农业科学, 2016, 53(4): 698-705.
- [25] 丁正蛟, 孟 帅, 刘亚君. 鬼伞属真菌的杀线虫活性 [J]. 化学与生物工程, 2017, 34(4): 19-20, 27.
- [26] 青岛农业大学. 一株辐毛小鬼伞及其在防治小麦禾谷孢囊线虫病中的应用: 中国, CN201610420943. 9 [P]. 2017-02-22.
- [27] 吴燕燕, 唐运林, 顾偕铖, 等. 重庆地区 3 株球孢白僵菌的分离鉴定 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2019, 41(8): 14-19.

Isolation and Identification of Entomogenous Fungi from Dead Larva of *Mythimna separata* of Chongqing Area

GENG Jing-ke^{1,2,3}, WU Yan-yan^{1,2,4}, GU Ruo-cheng^{1,2,4},
TANG Yun-lin^{1,2,4}, WEI Jun-hong^{1,2,3,4},
PAN Guo-qing^{1,2,3,4}, ZHOU Ze-yang^{1,2,4,5}

1. State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Southwest University, Chongqing 400715, China;
2. Chongqing Key Laboratory of Microsporidia Infection and Control, Southwest University, Chongqing 400715, China;
3. School of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China;
4. Key Laboratory of Sericultural Biology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture, Southwest University, Chongqing 400715, China;
5. College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China

Abstract: *Mythimna separata* is a common Lepidoptera pest. As a fulminant and migratory pest, *M. separata* is a serious hazard to crops. Entomogenous fungi are the largest group of insect pathogenic microorganisms, which can effectively control the population of pests in nature. In order to control *M. separata* and other similar pests like *Spodoptera frugiperda* and enrich the resources of entomogenous fungi, an experiment was made, in which the dead larvae of *M. separata* collected from a sorghum field in Jiangjin of Chongqing were used as the experimental material, and a total of 6 fungal isolates were isolated and characterized with the traditional culture method. Morphological observation and molecular biological identification classified them into 3 genera, namely *Fusarium*, *Penicillium* and *Coprinellus*. Entomogenous fungi are of great value in pest biocontrol, for they can induce epidemics in insect populations, thus keeping the populations of inset pests at a relatively low level. The isolates of *Fusarium* and *Penicillium* obtained in this experiment have the potential to kill plant insect pests, while the *Coprinellus* can be used to control the population of nematodes. The insecticidal effects of these fungi on *M. separata* and *S. frugiperda* will be studied in more detail in further research.

Key words: *Mythimna separata*; entomogenous fungus; isolation and identification; Chongqing Area; *Spodoptera frugiperda*