

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2023.07.006

黄汉成, 吴天乐, 陈绍基, 等. 白色拟青霉分离鉴定及优势毒力菌株筛选 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2023, 45(7): 67-74.

白色拟青霉分离鉴定及优势毒力菌株筛选

黄汉成¹, 吴天乐², 陈绍基², 陆航琼², 周荣琼²

1. 西南大学 动物科学技术学院, 重庆 荣昌 402460; 2. 西南大学 动物医学院, 重庆 荣昌 402460

摘要: 用选择性培养方法从土壤中分离纯化 6 株真菌, 经形态学初步鉴定为拟青霉属 *Simplicillium*. 采用 PCR 扩增、克隆了 6 株真菌的核糖体 ITS 序列, 并进行系统进化分析, 以明确菌株的分类地位. 结果显示, 6 株真菌的序列长度为 616 bp. 系统进化分析发现, 6 株真菌与白色拟青霉 *Simplicillium lanosoniveum* (GeneBank NO. KT878334, MT001191) 在同一进化分支上, 相似性为 99.9%~100%. 形态学和分子鉴定表明, 6 株真菌为 *S. lanosoniveum*. 采用孢子浸渍法, 用含量为 1×10^8 个孢子/mL 的孢子悬液侵染家蚕 3 龄幼虫进行优势毒株筛选(球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 和金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 为阳性对照组). 结果显示, 各处理组累积校正死亡率最高为 92.30%, 最低为 30.78%. 其中, *S. lanosoniveum*-SI05, SI06 菌株接种 7 d 后累积校正死亡率分别为 84.62% 和 89.29%, 致死中时 LT_{50} 分别为 3.96 d 和 3.73 d. *S. lanosoniveum*-SI05, SI06 菌株为家蚕 3 龄幼虫致病优势毒力菌株. 本研究为 *S. lanosoniveum* 菌株的生物防治奠定了基础.

关键词: 白色拟青霉; 鉴定; 优势毒力菌株; 筛选

中图分类号: Q949.32

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2023)07-0067-08

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Isolation, Identification and Screen of Dominant Virulent Strains of *Simplicillium lanosoniveum*

HUANG Hancheng¹, WU Tianle², CHEN Shaoji²,
LU Hangqiong², ZHOU Rongqiong²

1. College of Animal Science and Technology, Southwest University, Rongchang Chongqing 402460, China;

2. College of Veterinary Medicine, Southwest University, Rongchang Chongqing 402460, China

Abstract: Six fungal strains were isolated and purified from the soil by selective culture method, and morphologically preliminarily identified as *Simplicillium* genus. Then the ribosomal ITS sequences of six fungal strains were amplified and cloned by PCR, and phylogenetic tree was constructed to clarify the taxo-

收稿日期: 2023-02-05

基金项目: 重庆市自然科学基金项目(cstc2019jcyj-msxm2338); 中央高校基本科研业务费资助项目(XDJK2020RC001).

作者简介: 黄汉成, 讲师, 主要从事动物生物学研究.

通信作者: 周荣琼, 教授.

onomic position of fungal strains. The results showed that the ITS sequences of the six strains were 616 bp in length. Phylogenetic analysis showed that the six fungal strains were on the same evolutionary branch and 99.9%–100% homology with the *S. lanosoniveum* (GeneBank NO. KT878334 and MT001191). Combined with morphological and molecular identification, the six isolates of fungi were identified as *S. lanosoniveum*. The dominant virulent strain was selected by spore impregnation method by infesting the 3rd instar of *Bombyx mori* with a concentration of 1×10^8 spores/mL (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* were used as positive controls). The results showed that the highest cumulative corrected mortality rate was 92.30% and the lowest was 30.78% for each treatment. Among them, the cumulative corrected mortality of *S. lanosoniveum*-Sl05 and Sl06 strains after 7 days of inoculation were 84.62% and 89.29%, respectively, and the median mortality (LT_{50}) was 3.96 days and 3.73 days, respectively. Therefore, the *S. lanosoniveum*-Sl05 and Sl06 strains were the dominant virulent strains for the third instar larvae of the *B. mori*. The study lays the foundation for the biological control of *S. lanosoniveum* strains.

Key words: *Simplicillium lanosoniveum*; identification; dominant virulent strain; screening

昆虫致病真菌附着于昆虫体表及体内，迅速增殖并致寄主死亡^[1]。真菌孢子附着并侵入昆虫体壁后在体腔内繁殖，菌丝利用宿主组织营养不断生长，最终导致虫体死亡。据不完全统计，全球已记载的昆虫病原真菌约 100 属 800 多种^[2]。我国目前已经报道的昆虫致病真菌约 400 多种，其中寄生性昆虫致病真菌约 200 多种^[3]，主要经昆虫体壁入侵到宿主体内，有时也可以经呼吸道和消化道感染^[4-5]。在昆虫病原真菌入侵寄主时，寄主也会通过自身的体液免疫和细胞免疫产生应激反应，对真菌入侵具有一定的防御能力。在自然界中由真菌引起的流行病可自然制约昆虫的种群数量，因此利用昆虫病原真菌进行生物防治已受到人们的青睐和重视。

拟青霉属 *Simplicillium* 是 21 世纪初由生命科学家划分出的一个新属，是一类寄生性真菌，属于肉座菌目 Hypocreales 虫草科 Cordycipitaceae。 *Simplicillium* 属的分生孢子具球形粘性末端，透明，呈椭圆形、纺锤形或圆柱形等形态^[6-8]。 *Simplicillium* 属真菌广泛分布于自然生态系统中，通常可寄生于植物组织、土壤、线虫及真菌蘑菇中^[9-10]，在生物防控和生物活性化合物应用上具有非常重要的作用，因此该菌具有较高的生态价值和经济价值。

为了解土壤真菌的多样性和分布情况，本试验采用平板稀释法，利用选择性培养基从土壤中分离并鉴定白色拟青霉 *S. lanosoniveum* 菌株；同时采用孢子浸渍法^[11]筛选出对家蚕 3 龄幼虫具有高毒力的优势菌株，以期对白色拟青霉 *S. lanosoniveum* 菌株的生物防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验分别从重庆市荣昌区普通土壤、玉米地土壤、香蕉地土壤、柑橘树土壤和李子树土壤这 5 种土壤类型中采集了 6 个土壤样本(表 1)。采集样本时，需先铲去表层约 5 cm 土壤，采集 5~20 cm 深度的土壤，过滤除去沙石，装进塑料袋中做好标签，4℃条件保存备用。球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 购自广州多宇多生物科技有限公司。金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 购自重庆聚立信生物工程有限公司。家蚕 *Bombyx mori* 由家蚕基因组生物学国家重点实验室(西南大学)提供，饲养于 16 cm×10 cm×8 cm 透气打孔饲养盒中，需每天更换新鲜桑叶饲养。

表 1 6 株 *Simplicillium lanosoniveum* 菌株来源

样本来源	样本编码	样本来源	样本编码
普通土壤	<i>S. lanosoniveum</i> -Sl01isolate	香蕉地土壤	<i>S. lanosoniveum</i> -Sl04isolate
玉米地土壤	<i>S. lanosoniveum</i> -Sl02isolate	柑橘树土壤	<i>S. lanosoniveum</i> -Sl05isolate
玉米地土壤	<i>S. lanosoniveum</i> -Sl03isolate	李子树土壤	<i>S. lanosoniveum</i> -Sl06isolate

PCR 试剂(MgCl₂、Buffer、dNTPs 等)、rTaq 酶、pMDTM19-T Vector、DL 2000 DNA Marker、琼脂糖、Amp、X-gal、IPTG 购自大连宝生物公司;蛋白胨 Tryptone、酵母提取物 Yeast extract 购自 Oxoid 公司;蛋白酶 K 购自 Merk 公司;DNA 凝胶回收试剂盒、DH5 α 感受态细胞购自 TransGen Biotech 公司;重组质粒 WizardTM Plus SV Minipreps DNA Purification System 试剂盒购自 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离纯化

称取 5 g 土壤样本,加入灭菌蒸馏水 45 mL,于漩涡振荡器振荡 5 min,使震荡液散布均匀后稀释 10 倍。移液枪吸取 0.5 mL 振荡液涂布于马铃薯蛋白胨培养基(PPDA),放置在 27 °C 恒温保湿箱内培养,待平板生长出单菌落后挑取转至马铃薯培养基(PDA),需至少挑取 3 次以上 PDA 培养基单菌落才可纯化目的菌株。

1.2.2 菌株的形态学鉴定

将分离纯化的菌落接种于 PDA 培养基中央,27 °C 恒温保湿箱内培养,定期观察菌落生长状态并记录其颜色、形态,参考文献[12]对菌株进行形态学初步鉴定。

1.2.3 菌株的分子生物学鉴定

(1) 菌株 DNA 提取

刮取适量真菌分生孢子或菌丝于裂解管内,加入 270 μ L 的 SDS 裂解液^[13]和 30 μ L(50 μ g/ μ L)蛋白酶 K 充分混匀,隔夜 55 °C 水浴 12~24 h,其间多次振荡混匀离心管使其裂解充分,采用酚/氯仿法抽提样本 DNA。提取出的 DNA 样品分装后,于-20 °C 冰箱保存备用。

(2) PCR 扩增

参考 Chen 等^[14]的真菌 ITS(Internal Transcribed Spacer, ITS)引物扩增序列,该序列段位于 18S rRNA 和 28S rRNA 的保守区,核苷酸序列为:ITS-F: 5'-TAACAAGGTCTCCGTTGGTGA-3' (21 bp); ITS-R: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (20 bp);引物由重庆擎科兴业生物技术有限公司合成。使用时加灭菌超纯水稀释,稀释度为 10 μ mol/ μ L,分装后于-20 °C 保存备用。PCR 反应体系为 25 μ L,其中 3 μ L Mg²⁺ (25 mmol/L), 2.0 μ L dNTPs(2.5 μ mol/L), 2.5 μ L 10 $\times$ PCR buffer(不含 Mg²⁺), 0.5 μ L 上游引物 ITS-F(10 μ mol/L), 0.5 μ L 下游引物 ITS-R(10 μ mol/L), 2.0 μ L 模板 DNA, 0.2 μ L rTaq 酶(5 U/ μ L), 灭菌双蒸水 14.3 μ L。反应在 PCR 仪 BIO RAD S1000 上进行,预期扩增片段约为 600 bp。反应参数为预变性 94 °C 3 min,变性 94 °C 1 min,退火温度 56 °C 1 min,延伸 72 °C 1 min,循环反应 35 次,最后 72 °C 延伸 10 min,同时设置阴性对照组。PCR 产物经 10 g/L TAE 琼脂糖凝胶电泳后,成像系统显示记录分析结果。

(3) PCR 产物的克隆

按照北京全式金生物公司的 Agrose Gel DNA Extraction Kit 说明书进行凝胶回收。将回收的 PCR 产物与 pMDTM19-T Vector 载体连接:取 PCR 管依次加入 5 μ L Ligation Solution I, 1 μ L pMDTM19-T Vector 载体, 3 μ L PCR 纯化产物, 1 μ L ddH₂O,混匀,16 °C PCR 扩增仪连接 1 h。连接后将上述连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞,涂布于含 Amp、X-gal 和 IPTG 的 LB 琼脂平板中,置恒温箱 37 °C 过夜培养 12~14 h 后,筛选阳性克隆。

(4) 测序与序列分析

挑取阳性克隆菌液送重庆擎科兴业生物技术有限公司测序。将测序结果于美国国家生物信息中心(NCBI)数据库进行 BLAST 比对,同时基于 ITS 下载了不同的序列: *S. lanosoniveum* (GeneBank NO. KT878334、MT001191), *S. cylindrosporum* (GeneBank NO. NR_111023), *S. obclavatum* (GeneBank NO. NR_111099), *S. lamellicola* (GeneBank NO. NR_111098), *S. chinense* (GeneBank NO. NR_1155782), *S. minatense* (GeneBank NO. NR_111025), *S. subtropicum* (GeneBank NO. NR_111024), *S. aogashimaense* (GeneBank NO. NR_111026)和 *S. sympodiophorum* (GeneBank NO. NR_111027); *Lecanicillium kalimantanense* (GeneBank NO. NR_121200), *L. araneicola* (GeneBank NO. NR_121208), *L. primulinum* (GeneBank NO. NR_119418)和枝顶孢属 *Acremonium* sp. (GeneBank NO. EF577237)。采用 MegAlign 5.0 的邻接法构建种系发育进化树,进化树的可靠性用 Bootstrap 进行分析,共 1 000 个重复。

1.2.4 *S. lanosoniveum* 优势毒力菌株筛选

(1) 孢子悬液制备

菌株分生孢子在 PDA 培养基中长满,加入灭菌的 0.05%吐温-80,将分生孢子连同孢子梗一同刮下,置于锥形瓶中,振荡器振荡 30 min 使分生孢子和菌丝分离,3 层纱布过滤获得孢子悬液.用血球计数板将孢子含量调成 1×10^8 个孢子/mL.

(2) 优势毒力菌株筛选

采用孢子液浸渍法^[11]对家蚕 3 龄幼虫毒力进行测定.挑选大小相近的健康试虫,将其浸入孢子悬液中约 6 s,取出用滤纸吸干多余水分后,放回培养盒,饲养温度为 $(25\pm 1)^\circ\text{C}$,相对湿度为 90%,每天及时饲养新鲜桑叶并清理粪便颗粒,发现病死虫体即挑出,保持饲养环境干净.每天记录家蚕 3 龄幼虫的死亡情况,连续观察 12 d.每处理 3 个重复,每盒 30 头.阴性对照组为 0.05%吐温-80 无菌水代替孢子悬浮液浸虫,筛选出高致病力菌株.阳性对照组为球孢白僵菌 *B. bassiana* 和金龟子绿僵菌 *M. anisopliae*,以及阴性对照组(CK)所需的 0.05%吐温-80 无菌水,以评估 *S. lanosoniveum* 的致病效果.

(3) 数据分析

数据分析应用 Excel(2010)先计算出接种后家蚕的死亡率及僵虫率,用 DPS(V 9.01)软件处理试验数据,求出毒力回归方程,计算其致死中时间 LT_{50} (median lethal time),据此分析菌株的毒力^[15].死亡率和校正死亡率的计算采用 Abbott 公式校正^[16].

公式为:

$$A = (a/Z) \times 100\%$$
$$B = (b - c)/(1 - c) \times 100\%$$

式中: A 代表死亡率, a 代表死亡虫数, Z 代表供试虫数, B 代表校正死亡率, b 代表处理死亡率, c 代表对照死亡率.

2 结果与分析

2.1 菌株的形态学鉴定

菌株分离纯化培养 2 周后,菌落正面呈白色,直径约 8 cm,圆形,有同心环纹,发达的绒毛状菌丝,奶油絮状或棉花样,质地粗厚干燥,结构致密,不透明;发育成熟过程中背面菌落由白色变为淡黄色,呈放射状裂纹(图 1).根据上述形态学观察结果,初步判定分离所得的 6 株土壤分离株为虫草科 Cordycipitaceae, *Simpli-cillium* 属真菌.将本次试验的土壤分离株分别编号为 *S. lanosoniveum*-Sl01,Sl02,Sl03,Sl04,Sl05,Sl06.

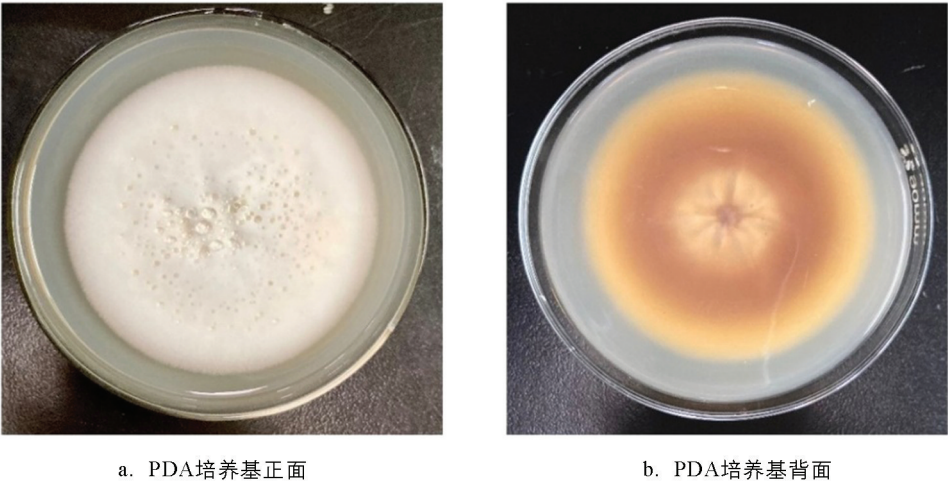
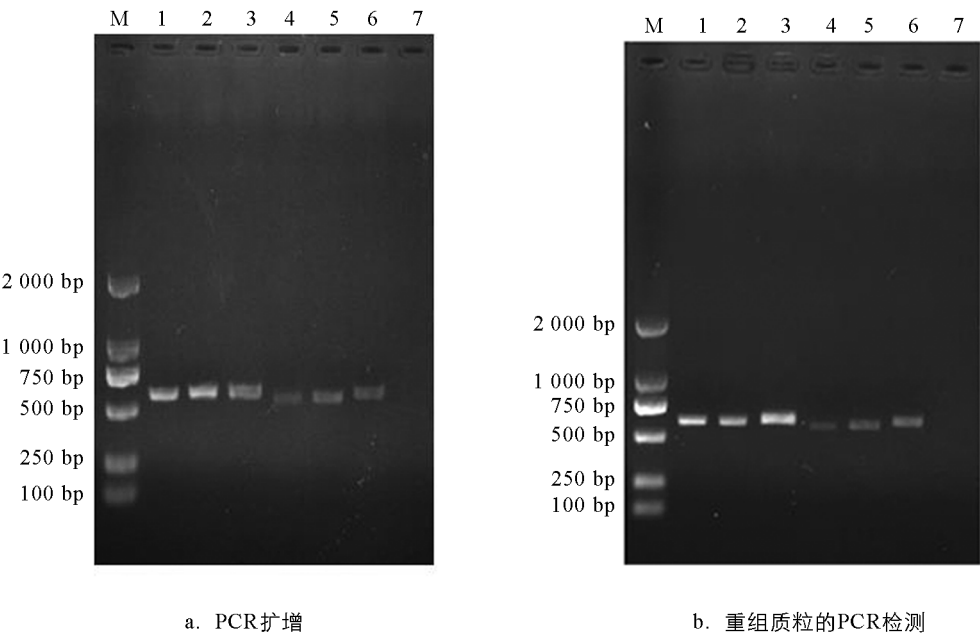


图 1 *S. lanosoniveum* 在 PDA 培养基上的生物学形态

2.2 菌株的分子生物学鉴定

为进一步确定样本菌株的种属地位,本文基于 ITS 序列进行了分子鉴定.结果显示,PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后,6 株菌株均扩增出约 616 bp 的条带(图 2a);阳性克隆的重组质粒经菌液 PCR 同样扩增出大约 616 bp 的 ITS 序列条带(图 2b).扩增条带与预期片段大小相符,阴性对照没有出现条带.



M: DL 2000 Marker; 1: SI01 菌株; 2: SI02 菌株; 3: SI03 菌株; 4: SI04 菌株; 5: SI05 菌株; 6: SI06 菌株; 7: 阴性对照.

图 2 *S. lanosoniveum* 菌株的分子鉴定

2.3 种系发育进化树分析

对 PCR 鉴定为阳性的重组菌液进行测序. 结果显示, 6 株菌株获得的 PCR 产物序列长度一致, 均为 616 bp. 经 NCBI 网站 BLAST 比对, 本研究获得的真菌 ITS 序列与 *S. lanosoniveum* (GeneBank NO. KT878334、MT001191) 的同源性达 99.9%~100%; 对本次研究所得的 6 株 *S. lanosoniveum* 序列与下载的 14 株序列应用程序软件 MegAlign 5.0 中的 Neighbour-Joining 构建种系发育进化树(图 3), 结果显示 6 株 *S. lanosoniveum* 与 GeneBank 登记的 *S. lanosoniveum* (GeneBank NO. KT878334、MT001191) 位于同一个分支上, 表明其遗传距离最近; 与 *Acremonium* sp. (GeneBank NO. EF577237) 的遗传距离最远.

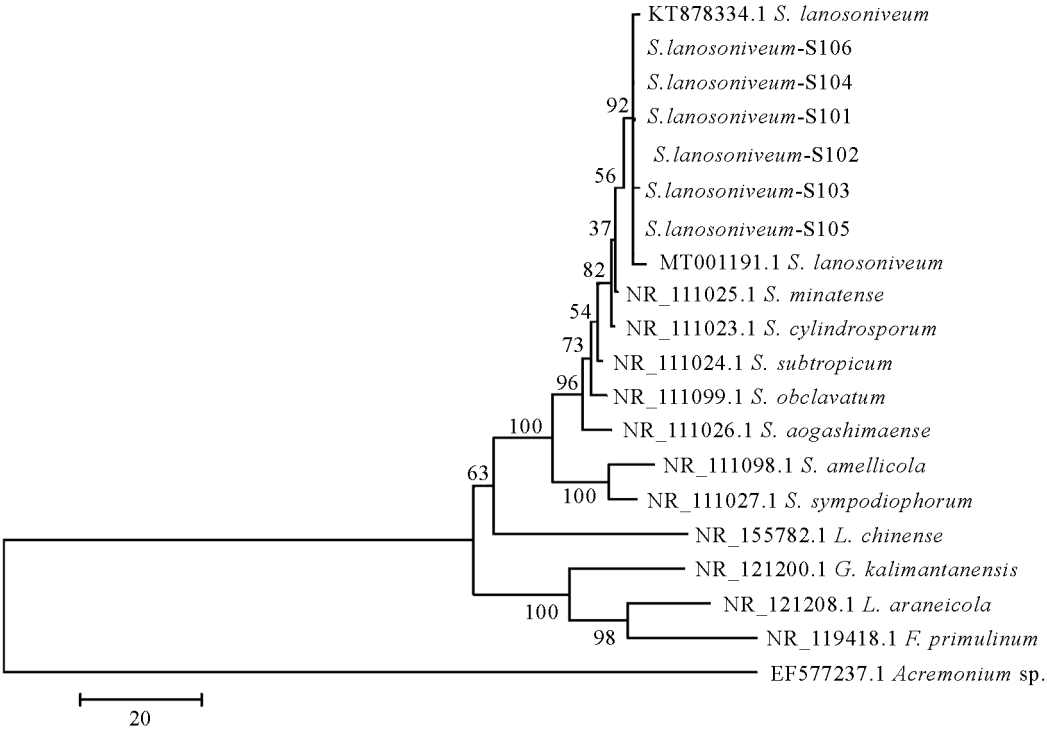


图 3 基于 ITS 序列构建的 *S. lanosoniveum* 系统发育分析

2.4 S. lanosoniveum 优势毒力菌株的筛选

家蚕 3 龄幼虫接种不同菌株后累积死亡率见图 4。不同菌株对家蚕 3 龄幼虫均具有致病性，累积死亡率随被侵染时间延长而增大。累积校正死亡率可以反映出毒株致病力的强弱，累积校正死亡率越高，致病力越强。球孢白僵菌对照组累积校正死亡率最高，达 92.30%；接种分离菌株 S. lanosoniveum-Sl05,Sl06 后第 8 d 累积校正死亡率大于 80.00%，而其余 4 株 S. lanosoniveum-Sl01,Sl02,Sl03,Sl04 累积校正死亡率分别为 30.78%，61.54%，46.15%，69.23%。

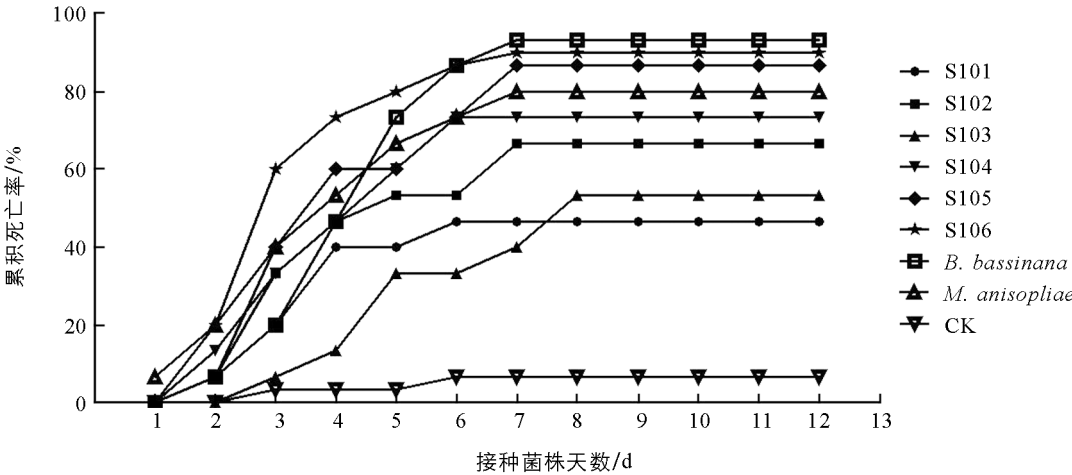


图 4 接种不同菌株后家蚕 3 龄幼虫累积死亡率

不同菌株对家蚕 3 龄幼虫的毒力回归方程如表 2 所示。其中，S. lanosoniveum-Sl05,Sl06 致死中时 LT_{50} 分别为 3.96 d 和 3.73 d，小于其他同期 S. lanosoniveum 菌株处理组。虽然 S. lanosoniveum-Sl04 致死中时 LT_{50} 为 4.11 d，同样具有优势，但是累积校正死亡率为 69.23%，相对较低。阳性对照组球孢白僵菌和金龟子绿僵菌 LT_{50} 分别为 3.92 d 和 3.63 d。

综合校正死亡率和致死中时两个指标，在 6 株样本菌株中 S. lanosoniveum-Sl06 的校正死亡率最高，为 89.29%，致死中时(LT_{50})最短，为 3.73 d。S. lanosonievum-Sl05 次之，校正死亡率为 84.62%，致死中时(LT_{50})为 3.96 d。这两株菌株表现出良好的毒力活性，是 S. lanosoniveum 家蚕 3 龄幼虫致病的优势菌株。

表 2 S. lanosoniveum 优势毒力菌株筛选

菌株	试虫数	校正死亡率/ %	回归方程	致死中时 (LT_{50})/d	相关系数
Sl01	30	30.78	$y=3.729\ 9x+2.397\ 7$	4.98	0.980\ 0
Sl02	30	61.54	$y=3.250\ 6x+2.637\ 9$	5.33	0.858\ 9
Sl03	30	46.15	$y=3.599\ 8x+1.809\ 8$	7.69	0.952\ 7
Sl04	30	69.23	$y=3.518\ 6x+2.838\ 6$	4.11	0.995\ 3
Sl05	30	84.62	$y=4.303\ 3x+2.425\ 7$	3.96	0.941\ 6
Sl06	30	89.29	$y=3.941\ 3x+2.744\ 8$	3.73	0.954\ 1
球孢白僵菌	30	92.30	$y=5.696\ 2x+1.619\ 6$	3.92	0.987\ 3
金龟子绿僵菌	30	76.92	$y=2.822\ 0x+3.419\ 3$	3.63	0.994\ 5

注：y 为时间；x 为感染率。

3 讨论

土壤中昆虫致病真菌种类繁多，其中最大生防类群的虫生真菌占比达 60%以上，表明土壤能为虫生真菌研究提供最基础且最丰富的来源^[17]。Simplicillium 属真菌在土壤、海水、空气等环境中的生活模式丰富多样^[14]，可作为共生真菌、内生真菌、昆虫致病真菌和真菌寄生菌被分离出来。土壤中虫生真菌菌株的

分离方法通常有两种,即僵虫分离法和土壤分离法^[18]。其中,土壤分离法更加简便易行、环保有效,故常被研究人员使用。王品^[19]利用选择性培养基标准平板技术,对我国 4 大茶区茶园土壤中的虫生真菌进行分离,成功分离出 4 属 11 种虫生真菌菌株。本试验同样采用土壤分离法成功分离出了 6 株 *S. lanosonieum* 菌株,表明土壤中存在一定数量的昆虫致病真菌,且使用土壤分离法确实简便易行。据耿敬可等^[20]的研究报道,虫生真菌的种属特异性较强,其宿主谱和毒力会因菌株不同而呈现出差异。因此,对土壤中更多未知菌种进行分类鉴定,将有利于丰富和增加虫生真菌资源库的资源。

真菌种类的鉴定包括形态学鉴定和分子生物学鉴定。传统的形态学鉴定主要是通过对培养后真菌的菌落形态和显微镜下分生孢子、菌丝等的生长特征来进行鉴别^[15]。由于生长的营养条件或者环境不同,真菌生长形态会发生改变,并且自然界中真菌种类繁多,存在许多外观相似的物种,若只进行形态学鉴定很难对其进行准确的属种分类,而分子生物学技术则能很好地解决近缘种之间分类难的问题。分子鉴定中常用 18S rDNA、ITS 和线粒体序列^[21]等对真菌进行鉴定。其中,核糖体 r DNA 中内转录间隔区 ITS 在真菌种内高度保守,而在种间具有显著而丰富的变化^[22],在真菌物种亲缘关系的研究中具有很高的参考价值,因此被广泛应用于真菌鉴定及系统发育研究^[23]。Chen 等^[14]从中国西南地区分离纯化出 3 种新的 *Simplicilium* 属菌株,命名为 *S. cicadellidae*, *S. formicidae* 和 *S. lepidopterorum*。经形态学观察、分子鉴定及系统发育分析,最终确定为 3 个新物种,从而丰富了中国西南地区的虫生真菌资源。Baiswar 等^[24]从印度阔叶树患病叶片中分离出一株昆虫致病真菌,经扫描电镜下形态表征、ITS 序列分析及系统发育分析,也鉴定为 *S. lanosonieum*。本试验从不同土壤中获得 6 株真菌,经 ITS 克隆测序,结果长度均为 616 bp,表明 ITS 序列具有较高的保守性。系统发育进化树分析显示,6 株真菌与已登录的 *S. lanosonieum* (GeneBank NO. KT878334、MT001191)位于同一分支,相似性为 99.9%~100%,与 *S. minatense* 亲缘关系最近,而与形态相似的枝顶孢属 *Acremonium* sp. 亲缘关系最远,表明 ITS 序列种内差异较小,种间差异大,可作为 *S. lanosonieum* 菌株鉴定的遗传标记。

昆虫病原真菌是昆虫病原微生物中最大的类群,所产生的流行病对自然界中害虫种群数量的控制具有关键性作用。因此,寻找高毒力的虫生真菌菌株,开发以其为主要成分的真菌杀虫剂具有广阔的应用前景。Sujithra 等^[25]从褶皱螺旋粉虱若虫尸体中分离出一株昆虫致病真菌,鉴定为 *S. lanosonieum*;以浸渍接种法对粉虱发育的各个时期进行毒力测试,发现其对粉虱虫卵、1~3 龄若虫和蛹等阶段均具有较高的毒力。孙明等^[26]从土壤中分离的球孢白僵菌,筛选出了对多种蜚致死率达 100% 的高毒力菌株。本试验获得的 6 株 *S. lanosonieum* 毒力有所差异,其中 *S. lanosonieum*-SI05,SI06 对家蚕 3 龄幼虫的累积校正死亡率大于 80.00%,最高可达 89.29%,具备较高的毒力,说明本研究从土壤中分离筛选的昆虫病原真菌具有生物防治的应用前景。

4 结论

从土壤中分离的 6 株真菌,经形态学和分子生物学鉴定为 *S. lanosonieum* 真菌,其中 *S. lanosonieum*-SI06 和 *S. lanosonieum*-SI05 菌株感染家蚕 3 龄幼蚕,两株菌株均表现出良好的毒力活性,是 *S. lanosonieum* 致病家蚕 3 龄幼虫的优势菌株。

参考文献:

- [1] 严森,任小云,王登杰,等. 昆虫病原真菌在害虫防治中对天敌生物的影响研究进展 [J]. 中国生物防治学报, 2023, 39(1): 221-230.
- [2] WANG C S, FENG M G. Advances in Fundamental and Applied Studies in China of Fungal Biocontrol Agents for Use Against Arthropod Pests [J]. Biological Control, 2014, 68: 129-135.
- [3] 余垚颖,郭应菊,杨雪,等. 我国虫生真菌的研究现状 [J]. 四川农业科技, 2018(12): 27-29.
- [4] LEGER R J, COOPER R M, CHARNLEY A K. Production of Cuticle-Degrading Enzymes by the Entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during Infection of Cuticles from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta* [J]. Microbiology, 1987, 133(5): 1371-1382.
- [5] 黄刚,徐明勇,钱凤英,等. 白僵菌对烟蚜的致病性研究 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(33): 20528-20529.

- [6] WEI D P, WANASINGHE D N, HYDE K D, et al. The Genus *Simplicillium* [J]. MycoKeys, 2019, 60: 69-92.
- [7] ZARE R, GAMS W. A Revision of the *Verticillium Fungicola* Species Complex and Its Affinity with the Genus *Lecanicillium* [J]. Mycological Research, 2008, 112(7): 811-824.
- [8] SUNG G H, HYWEL-JONES N L, SUNG J M, et al. Phylogenetic Classification of *Cordyceps* and the Clavicipitaceous Fungi [J]. Studies in Mycology, 2007, 57: 5-59.
- [9] CHEN W H, LIU C, HAN Y F, et al. Three Novel Insect-Associated Species of *Simplicillium* (Cordycipitaceae, Hypocreales) from Southwest China [J]. MycoKeys, 2019, 58: 83-102.
- [10] ZARE R, GAMS W. A Revision of *Verticillium* Section Prostrata. IV. the Genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* Gen. Nov. °) [J]. Nova Hedwigia, 2001, 73(1/2): 1-50.
- [11] 何学友, 蔡守平, 杜月飞, 等. 感染油茶象幼虫的高致病力金龟子绿僵菌菌株筛选 [J]. 林业科学, 2015, 51(8): 52-59.
- [12] GOETTEL M S, DOUGLAS INGLIS G. Fungi [M] //Manual of Techniques in Insect Pathology. Amsterdam: Elsevier, 1997.
- [13] 陈绍基, 李芳, 谭纯, 等. 重庆市荣昌区中华田园犬蜱种鉴定及序列分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2021, 43(5): 56-61.
- [14] CHEN W, XIE W W, CAI W, et al. Entomopathogenic Fungi Biodiversity in the Soil of Three Provinces Located in Southwest China and First Approach to Evaluate Their Biocontrol Potential [J]. Journal of Fungi, 2021, 7(11): 984.
- [15] GÄTZ M, NIRENBERG H, KRAUSE S, et al. Fungal Endophytes in Potato Roots Studied by Traditional Isolation and Cultivation-Independent DNA-Based Methods [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2006, 58(3): 404-413.
- [16] ABBOTT W S. A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide [J]. Journal of Economic Entomology, 1925, 18(2): 265-267.
- [17] DONG T Y, ZHANG B W, JIANG Y F, et al. Isolation and Classification of Fungal Whitefly Entomopathogens from Soils of Qinghai-Tibet Plateau and Gansu Corridor in China [J]. PLoS One, 2016, 11(5): e0156087.
- [18] 贾春生, 由士江, 高文韬. 利用黄粉虫分离土壤昆虫病原真菌 [J]. 昆虫知识, 2006, 43(2): 260-261, 280.
- [19] 王品. 我国茶园土壤昆虫病原真菌物种多样性与群落结构研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2013.
- [20] 耿敬可, 吴燕燕, 顾偕铖, 等. 重庆地区玉米黏虫僵虫体内虫生真菌的分离鉴定 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2020, 42(1): 9-15.
- [21] 王妮, 谢映平, 樊金华. 桑白盾蚧病原真菌 *Simplicillium lanosoniveum* 的致病性 [J]. 菌物学报, 2016, 35(5): 559-568.
- [22] DRIVER F, MILNER R J, TRUEMAN J W H. A Taxonomic Revision of *Metarhizium* based on a Phylogenetic Analysis of rDNA Sequence Data [J]. Mycological Research, 2000, 104(2): 134-150.
- [23] SUN M, REN Q Y, GUAN G Q, et al. Virulence of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces lilacinus* to the Engorged Female *Hyalomma anatolicum anatolicum* Tick (Acari: Ixodidae) [J]. Veterinary Parasitology, 2011, 180(3/4): 389-393.
- [24] BAISWAR P, NGACHAN S V, RYMBAI H, et al. *Simplicillium lanosoniveum*, a Hyperparasite on *Aecidium elaeagni-latifoliae* in India [J]. Australasian Plant Disease Notes, 2014, 9(1): 144.
- [25] SUJITHRA M, PRATHIBHA H V, RAJKUMAR M, et al. Entomopathogenic Potential of *Simplicillium lanosoniveum* Native Strain in Suppressing Invasive Whitefly, *Aleurodicus rugioperculatus* Martin (Hemiptera: Aleyrodidae), Infesting Coconut [J]. Journal of Fungi, 2021, 7(11): 964.
- [26] 孙明, 任巧云, 漆晶晶, 等. 球孢白僵菌对小亚璃眼蜚的毒力测定及其孢外水解酶活性分析 [J]. 中国动物检疫, 2021, 38(12): 116-120.