

[文章编号] 1003-4684(2023)02-0040-04

# 三株球孢白僵菌对小菜蛾室内毒力测定

王砚妮<sup>1</sup>, 李 敏<sup>1</sup>, 段先莉<sup>1</sup>, 龙 同<sup>2</sup>, 李文静<sup>3</sup>, 赵锦芳<sup>1</sup>

(1 湖北工业大学发酵工程教育部重点实验室, 湖北 武汉 430068; 2 湖北省生物农药工程研究中心, 湖北 武汉 430064;

3 湖北省农业科学院植保土肥研究所, 农业农村部华中作物有害生物综合治理重点实验室, 湖北 武汉 430064)

**[摘 要]** 为发掘生防潜力, 以小菜蛾为供试昆虫, 对从湖北省恩施州所采草地贪夜蛾僵蚕体上分离获得的三株球孢白僵菌 Bbyn-1、Bbyn-2 和 Bbyn-3 进行室内毒力测定。结果表明, 当孢子悬浮液浓度为  $1 \times 10^8$  个/mL 时, 接种 7 d 后菌株 Bbyn-1 的毒力最高累计死亡率为 97.66%; 当孢子悬浮液浓度为  $1 \times 10^8$  个/mL、接种量 150  $\mu$ L 时, 接种 7 d 后菌株 Bbyn-1 的毒力最高为 99.67%; 浸虫法接种 7 d 后菌株 Bbyn-3 的毒力最高为 96.94%; 涂抹法接种 7 d 后菌株 Bbyn-2 的毒力最高为 93.71%。与球孢白僵菌菌株 Bbyn-2 和 Bbyn-3 相比, 菌株 Bbyn-1 有较高的致病力, 具有进一步研究和开发的潜力。

**[关键词]** 球孢白僵菌; 毒力测定; 小菜蛾

**[中图分类号]** S476.12 **[文献标识码]** A

小菜蛾 (*Plutella xylostella*), 俗称“吊丝虫、两头尖”, 是一种世界性的重要害虫, 主要危害十字花科蔬菜<sup>[1-3]</sup>。其为害特点: 世代周期短, 繁殖力、迁移、抗逆能力和适应性强<sup>[4-5]</sup>。对小菜蛾的防控主要依赖于化学农药, 但化学农药使其产生了严重的抗药性<sup>[6]</sup>, 破坏了田间的生态平衡, 同时也严重影响蔬菜的产量和品质<sup>[7]</sup>。因此开展小菜蛾的生物防治已成为人们探索控制其危害的重要途径。

球孢白僵菌是一种虫生真菌, 可通过体壁侵染寄生昆虫, 数量多达 750 多种<sup>[8]</sup>。在自然界中发现的由白僵菌致病死亡的昆虫约占 20%, 如小菜蛾、草地贪夜蛾、西花蓟马、桃蚜、松褐天牛等<sup>[9-11]</sup>。球孢白僵菌的低毒低残留、强致病力、高专一性及不易产生抗药性被广泛用于害虫的防治<sup>[12]</sup>。在我国, 已应用白僵菌防治 40 多种害虫获得成功, 年防治面积在 67 万  $\text{hm}^2$  以上<sup>[3]</sup>。

本研究以分离的 3 株球孢白僵菌菌株为试材, 对小菜蛾进行室内毒力测定, 比较不同接种方式的杀虫效果, 筛选出高毒力菌株, 为今后更好地开展生防试验提供数据参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

供试菌株球孢白僵菌株系 Bbyn-1、Bbyn-2、

Bbyn-3, 由自湖北省恩施州所采草地贪夜蛾僵蚕体上分离筛选获得, 保藏于湖北工业大学发酵工程教育部重点实验室。

### 1.2 供试昆虫

昆虫饲喂实验在湖北省农业科学院生物农药工程研究中心昆虫培养室开展, 选取鳞翅目小菜蛾的 2 龄健康无污染幼虫作为供试虫源, 室内饲养条件为  $(27 \pm 2)^\circ\text{C}$ , 相对湿度 60%~90%。

### 1.3 供试对照试验药剂

0.1% 的 Tween-80 无菌水作为空白对照  $\text{CK}_1$ 。

化学农药杀虫剂陶氏益农艾绿士购自临沂庆丰年农资有限公司。原药用体积分数为 0.1% 的 Tween-80 水溶液稀释 1000 倍, 作为溶剂对照  $\text{CK}_2$ 。

### 1.4 供试培养基与人工饲料

PDA 培养基: 200 g 马铃薯加水煮沸过滤至 1000 mL, 分别加入 20 g 的葡萄糖和 20 g 的琼脂。

人工饲料的配方参照杨亚军<sup>[13]</sup>的方法: 小麦粉 280 g、大豆粉 90 g、酵母粉 35 g、琼脂 25 g、复合维生素 B 0.2 g、胆固醇 12 g、山梨酸 2 g、抗坏血酸 12 g、对羟基苯甲酸甲酯 5 g、甲醛 4 mL、青霉素 0.2 g、无菌水 1500 mL。

### 1.5 孢子悬浮液制备

将 3 株球孢白僵菌菌株接种于 PDA 上培养至产孢, 真菌孢子用 0.1% 的 Tween-80 无菌水配制为

[收稿日期] 2021-11-12

[基金项目] 农业部华中作物有害生物综合治理重点实验室开放基金项目(2019ZTSJJ3); 湖北省教育厅重点项目(D20201403); 湖北省自然科学基金(2019CFB604); 湖北省新世纪高层次人才工程项目(鄂人社函[2018]666 号); 大学生创新创业训练计划(S202110500049)

[第一作者] 王砚妮(1996-), 女, 湖北宜昌人, 湖北工业大学硕士研究生, 研究方向为微生物

[通信作者] 赵锦芳(1980-), 女, 山东威海人, 湖北工业大学副教授, 研究方向为微生物

$1\times10^8$ 、 $1\times10^7$ 、 $1\times10^6$ 、 $1\times10^5$ 、 $1\times10^4$  个/mL 的悬浮液,作为供试菌液。

### 1.6 接种方式

**1.6.1 不同浓度的饲料浸润法** 在 24 孔养虫孔板的每孔中加入配制好的孢子悬浮液 100  $\mu$ L,轻轻摇动使其在饲料表面形成均匀的药膜,自然风干后接入整齐健康的小菜蛾 2 龄幼虫,每孔接虫 3 头,每个处理 72 头虫,3 次重复。设置 CK<sub>1</sub> 与 CK<sub>2</sub>。

**1.6.2 不同接种量的饲料浸润法** 在养虫孔板中分别加入浓度为  $10^8$  个/mL 的孢子悬浮液 50、100、150、200  $\mu$ L。其余操作同 1.6.1。

**1.6.3 浸虫法** 用软毛笔将供试小菜蛾 2 龄幼虫挑入浓度为  $10^8$  个/mL 的孢子悬浮液中,浸渍 20 s 后挑出,幼虫置于滤纸上吸去多余水分。然后将其接入含有饲料的 24 孔养虫孔板中,每孔接虫 3 头,每个处理 72 头虫,3 次重复。设置 CK<sub>1</sub> 与 CK<sub>2</sub>。

**1.6.4 涂抹法** 将幼虫置于滤纸上,用软毛笔蘸取浓度为  $10^8$  个/mL 的孢子悬浮液涂抹小菜蛾 2 龄幼

虫体表<sup>[14]</sup>。其余操作同 1.6.3。

### 1.7 数据统计和分析

将接虫后的养虫孔板移入室温( $27\pm2$ )  $^{\circ}$ C,相对湿度 60%~90%的观察室,观察虫体瘫软且连续 3 次触碰无反应时判定其死亡。逐日统计累计死亡率至用药后的 1 周。试验数据采用 SPSS 软件进行方差分析和差异显著性分析<sup>[15]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同浓度的饲料浸润法

从表 1 可以得出,接种 7 d 后,小菜蛾 2 龄幼虫的累计死亡率与不同的孢子悬浮液浓度之间呈正相关。3 个菌株对小菜蛾 2 龄幼虫的致死效果存在明显差异。其中,菌株 Bbyn-1 对小菜蛾 2 龄幼虫的致死效果最好,其次是菌株 Bbyn-2,但在孢子悬浮液浓度为  $1\times10^5$  个/mL 时,菌株 Bbyn-3 的致死效果更优,这可能与球孢白僵菌分生孢子在消化道的粘附力有关。

表 1 不同接种浓度接种 7 d 后对小菜蛾的累计死亡率

孢子悬浮液浓度/ (个 $\cdot$ mL <sup>-1</sup> )	供试虫 数/头	累计死亡率/%		
		Bbyn-1	Bbyn-2	Bbyn-3
$10^8$	72	97.66 $\pm$ 0.62 <sup>a</sup>	93.43 $\pm$ 0.34 <sup>b</sup>	94.42 $\pm$ 0.77 <sup>b</sup>
$10^7$	72	93.59 $\pm$ 0.10 <sup>ab</sup>	91.31 $\pm$ 1.02 <sup>bc</sup>	86.24 $\pm$ 0.59 <sup>c</sup>
$10^6$	72	89.66 $\pm$ 0.83 <sup>b</sup>	86.14 $\pm$ 0.50 <sup>c</sup>	70.88 $\pm$ 1.40 <sup>d</sup>
$10^5$	72	82.32 $\pm$ 0.31 <sup>c</sup>	55.87 $\pm$ 0.94 <sup>d</sup>	62.43 $\pm$ 0.15 <sup>de</sup>
$10^4$	72	79.00 $\pm$ 0.68 <sup>c</sup>	54.93 $\pm$ 0.13 <sup>d</sup>	46.81 $\pm$ 1.79 <sup>e</sup>
CK <sub>1</sub>	72	7.41 $\pm$ 1.60 <sup>d</sup>	7.41 $\pm$ 1.60 <sup>e</sup>	7.41 $\pm$ 1.60 <sup>f</sup>
CK <sub>2</sub>	72	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>

同一列的不同字母表示显著性差异( $P<0.05$ )(下同)

Bbyn-1、Bbyn-2 和 Bbyn-3 菌株在孢子悬浮液浓度为  $1\times10^8$  个/mL 时,接种 7 d 后,小菜蛾的累计死亡率分别为(97.66 $\pm$ 0.62)%、(93.43 $\pm$ 0.34)%和(94.42 $\pm$ 0.77)%。袁盛勇<sup>[4]</sup>使用孢子浓度为  $2.3\times10^8$  个/mL 的球孢白僵菌,接种 7 d 后,小菜蛾的校正死亡率为 77.4%。杨帆<sup>[8]</sup>使用孢子悬浮液浓度为  $10^8$  个/mL 的球孢白僵菌,接种 5 d 后,小菜蛾的校正死亡率为(87.59 $\pm$ 8.86)%。由此可见,本研究

的 3 株球孢白僵菌对小菜蛾均有较好的致死效果。

### 2.2 不同接种量的饲料浸润法

室内毒力测定结果(表 2)表明,3 株球孢白僵菌菌株在接种 7 d 后对小菜蛾 2 龄幼虫的毒力随着接种量的增加而提高。比较 3 株球孢白僵菌不同接种量对小菜蛾 2 龄幼虫的累计死亡率,发现球孢白僵菌菌株 Bbyn-1 的毒力最强,其接种量为 50  $\mu$ L 时,累计死亡率即可达到(94.48 $\pm$ 0.3)%。

表 2 不同接种量接种 7d 后对小菜蛾的累计死亡率

接种量/ $\mu$ L	供试虫 数/头	累计死亡率/%		
		Bbyn-1	Bbyn-2	Bbyn-3
200	72	99.67 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	97.70 $\pm$ 0.55 <sup>a</sup>	97.38 $\pm$ 0.55 <sup>a</sup>
150	72	99.67 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	96.88 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>	95.77 $\pm$ 1.29 <sup>ab</sup>
100	72	98.03 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	93.22 $\pm$ 0.27 <sup>b</sup>	94.67 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>
50	72	94.48 $\pm$ 0.34 <sup>b</sup>	86.97 $\pm$ 0.47 <sup>c</sup>	87.37 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>
CK <sub>1</sub>	72	7.86 $\pm$ 2.12 <sup>c</sup>	7.86 $\pm$ 2.12 <sup>d</sup>	7.86 $\pm$ 2.12 <sup>c</sup>
CK <sub>2</sub>	72	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>

### 2.3 3 株球孢白僵菌浸虫法与涂抹法的累计死亡率

在孢子悬浮液浓度不变的情况下,球孢白僵菌菌株对小菜蛾 2 龄幼虫的累计死亡率与接种时间呈

正相关。随着接种时间的延长,累计死亡率逐渐增高。如 Agboyi L K<sup>[6]</sup>所述,影响小菜蛾死亡率的因素之一是接种时间。

浸虫法中3株球孢白僵菌对小菜蛾的致死趋势相同,在第2天进入高发病期,第4天累计死亡率均达到50%以上,第6天累计死亡率均达到80%以上。接种5 d后,菌株 Bbyn-3 对2龄小菜蛾的致死效果最高;涂抹法中3株球孢白僵菌的毒力由高到低依次为菌株 Bbyn-2>菌株 Bbyn-1>菌株 Bbyn-3。在第4天时,累计死亡率均未达到50%,第6天时只有菌株 Bbyn-2 达到了80%以上。因此,菌株 Bbyn-2 在涂抹法中对2龄小菜蛾的致死率效果更好。

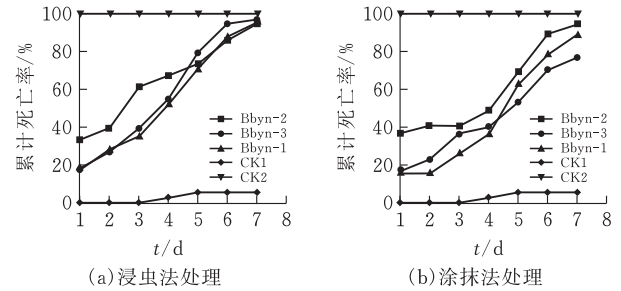


图1 3株球孢白僵菌对2龄小菜蛾的累计死亡率

#### 2.4 不同接种方式的死亡率

3株球孢白僵菌的不同接种方式对小菜蛾2龄幼虫均有较高的致死率。但饲料浸润法与浸虫法的防治效果要优于涂抹法,球孢白僵菌菌株 Bbyn-1、Bbyn-2、Bbyn-3 在饲料浸润法接种7 d后的累计死亡率分别达到98.02%、93.06%、94.87%;浸虫法接种7 d后的累计死亡率分别为95.34%、94.72%、96.94%;涂抹法接种7 d后的累计死亡率分别为88.69%、93.71%、76.67%。

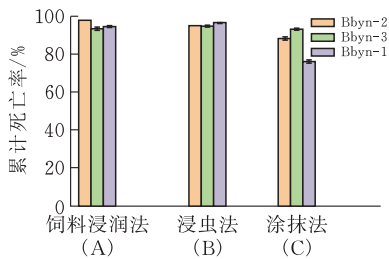


图2 不同接种方式接种7 d后对小菜蛾的累计死亡率

#### 2.5 小菜蛾感染球孢白僵菌后的外部症状

3种接种方式处理小菜蛾2龄幼虫后均有僵虫出现,说明3株球孢白僵菌对小菜蛾幼虫有确切的致死效果,且僵虫均出现在病虫死亡后的2~3 d。

感染初期,其病虫外表与健康虫体并无明显差异,且虫体颜色变为绿色(A);随着感染时间延长,小菜蛾活动反应迟缓,无吐丝行为;死亡后虫体色变黑。此现象与闫喜中<sup>[3]</sup>所观察的结果一致。死亡48 h后,虫体出现白色菌丝,在节间褶部位白色菌丝明显(B)。随着感染时间的增加,虫体逐渐被白色菌丝覆盖,且虫体开始萎缩,并快速长出分生孢子,遍

体如附白粉(C)。该过程与刘忱<sup>[16]</sup>观察球孢白僵菌浸染玉米螟的过程一致。



图3 3株球孢白僵菌对小菜蛾的侵染

### 3 结论

本研究以小菜蛾为供试昆虫,对前期从湖北省恩施州所采集的草地贪夜蛾僵蚕体上分离获得的三株球孢白僵菌 Bbyn-1、Bbyn-2 和 Bbyn-3 进行室内毒力测定。结果表明:3株球孢白僵菌菌株对小菜蛾2龄幼虫均有侵染效果,但感染昆虫的能力各不相同。在不同孢子悬浮液和不同接种量的处理中,对小菜蛾2龄幼虫毒力最高的是菌株 Bbyn-1,且毒力与孢子悬浮液浓度和接种量呈正相关。这个现象不仅表现在对小菜蛾防治中,在草地贪夜蛾防治中同样存在<sup>[17]</sup>;在涂抹法的处理中,菌株 Bbyn-2 对小菜蛾2龄幼虫的毒力显著高于菌株 Bbyn-1 和 Bbyn-3;在浸虫法的处理中,前期菌株 Bbyn-2 的毒力较高,后期菌株 Bbyn-3 的毒力效果最好。球孢白僵菌主要通过昆虫体壁、气节、伤口等外部途径或消化道、呼吸道等内部途径进入。因此,影响球孢白僵菌杀虫毒力的因素有很多,包括不同菌株对寄主的粘附力与适应性、菌株来源寄主物种不同<sup>[18]</sup>、次生代谢产物的种类和毒力、温度、湿度、接种方式等,菌株 Bbyn-3 的较低性能可能与粘附性和浸染角质层的能力有关。

Lakpo K<sup>[6]</sup>发现球孢白僵菌菌株 Bb11 在每周施药两次时能够有效将农场中小菜蛾的密度降低93%。BATHINA P<sup>[19]</sup>采用离体叶片法对小菜蛾进行生物测定,在接种15 d后小菜蛾2龄幼虫死亡率最高为70%~80%。袁盛勇<sup>[4]</sup>利用球孢白僵菌 MZ041016 菌株分生孢子不同梯度对小菜蛾的致病性进行测定,在分生孢子浓度为 $2.3 \times 10^8$ 孢子/mL时,接种8 d后小菜蛾的校正死亡率为92.4%。雷研圆<sup>[14]</sup>将孢子悬浮液浓度为 $10^7$ 个/mL的球孢白僵菌 Bb02 采用浸虫法接种7 d后,校正死亡率为73.79%,涂抹法接种7 d后校正死亡率为68.28%。与同类研究报道相比,本研究的3株球孢白僵菌菌株对2龄小菜蛾均有较强的毒力,其中菌株 Bbyn-1 和菌株 Bbyn-2 致病性更高,具有进一步研究和开发的潜力。



[参 考 文 献]

[1] 任忠虎. 小菜蛾高致病力球孢白僵菌株系筛选及其感染后的抗氧化反应研究[D].重庆:西南大学,2018.

[2] 相栋,旺珍,陈翰秋,等. 4 种增效剂对 3 种小菜蛾防治药剂的增效作用[J].植物保护,2021,47(04):310-316.

[3] 闫喜中,孙学俊,邓彩萍,等. 球孢白僵菌 GDS 菌株对小菜蛾致病力的测定[J].山西农业科学,2013,41(11):1221-1223.

[4] 袁盛勇,孔琼,王丽波,等. 球孢白僵菌 MZ041016 菌株对小菜蛾的室内毒力测定[J].江苏农业科学,2007(06):74-75.

[5] 曹伟平,宋健,冯书亮,等. 球孢白僵菌与低剂量化学杀虫剂对小菜蛾的协同增效作用[J].中国生物防治学报,2018,34(03):370-376.

[6] AGBOYI L K, KETO H G K, DOURO K, et al. Improving the efficiency of *Beauveria bassiana* applications for sustainable management of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) in West Africa[J]. Biological Control, 2020,144:104233.

[7] 汪亚萍,吴传伟,黎青. 球孢白僵菌防治小菜蛾的药效研究[J].浙江农业科学,2010(05):1044-1045.

[8] 杨帆,刘春来,王爽,等. 一株虫生真菌的分离鉴定及生防潜力研究[J].黑龙江农业科学,2019(12):72-77.

[9] 高红,张冉,万永继. 白僵菌的分类研究进展[J]. 蚕业科学,2011,37(04):730-736.

[10] 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(05):729-734.

[11] 陈威. 反式茴香脑和球孢白僵菌对桃蚜的联合杀虫作用及对其 GSTs 基因表达的影响[D].合肥:安徽农业

大学,2020.

[12] AMHA G, YONAS C, FASSIL A, et al. Phenotypic molecular and virulence characterization of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsam) Vuillemin, and *Metarhizium anisopliae* (Metschn) Sorokin from soil samples of Ethiopia for the development of mycoinsecticide[J]. Heliyon, 2021(5): 91-103.

[13] 杨亚军,徐红星,胡阳,等. 人工饲料饲养草地贪夜蛾的生长发育与繁殖[J].应用昆虫学报,2020,57(06):1341-1344.

[14] 雷妍圆,吕利华,何余容. 不同接种方式下球孢白僵菌对小菜蛾的致病力[J].植物保护,2010,36(06):142-146.

[15] 彭国雄,张淑玲,张维,等. 杀虫真菌与苏云金芽胞杆菌对草地贪夜蛾的联合室内杀虫活性研究[J].中国生物防治学报,2019,35(05):735-740.

[16] 刘忱,郭志红. 球孢白僵菌侵染玉米螟的电镜观察[J]. 电子显微学报,2019,38(02):144-149.

[17] 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(04):867-874.

[18] 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(08):14-19.

[19] BATHINA P, BONAM R. Effect of endophytic isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin on *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) in cabbage[J/OL]. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 2020,30(1):142-147.

Virulence of Three Strains of *Beauveria bassiana* against *Plutella xylostella*

WANG Yanni<sup>1</sup>, LI Min<sup>1</sup>, DUAN Xianli<sup>1</sup>, LONG Tong<sup>2</sup>, LI Wenjing<sup>3</sup>, ZHAO Jinfang<sup>1</sup>

(1 Key Laboratory of Fermentation Engin, Ministry of Education, Hubei Univ. of Tech., Wuhan 430068, China;

2 Hubei Academy of Agricultural Sciences, Biopesticide Engin. Research Centre, Wuhan 430064, China;

3 Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Central China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P. R. China, Wuhan 430064, China)

**Abstract:** Three strains of *Beauveria bassiana*, Bbyn-1, Bbyn-2, and Bbyn-3 isolated from silkworm of *Spodoptera frugiperda* (Enshi, Hubei Province) were bioassayed against the second instar larvae of *Plutella xylostella*. The results showed that the cumulative mortality of Bbyn-1 was 97.66% in the 10 8 conidia/mL. When the inoculation volume is 150 μL, the cumulative mortality of Bbyn-1 can rise up to 99.67%. After inoculating for 7 days, the cumulative mortality of Bbyn-3 was the highest 96.94% by the immersion method, and the cumulative mortality of Bbyn-2 was 93.71% by the smear method. The results also showed that the three strains of *Beauveria bassiana* had certain effect to *Plutella xylostella*. The virulence was higher than Bbyn-2 and Bbyn-3 strain, especially Bbyn-1 strain, which has the potential for further research and development.

**Keywords:** *Beauveria bassiana*; virulence; *Plutella xylostella*