

# 球孢白僵菌 Bb378 菌株的分离、鉴定及 对草地贪夜蛾的致病性研究\*

毕思佳\*\* 吴晨源 胡本进 徐丽娜 徐婷婷 胡 飞\*\*\*

(安徽省农业科学院植物保护与农产品质量安全研究所, 合肥 230031)

**摘 要** 【目的】筛选出对草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 高致病性的球孢白僵菌 Bb378, 并进一步研究菌株对玉米生长的影响及对草地贪夜蛾的驱避效果, 为应用球孢白僵菌防治草地贪夜蛾奠定基础。

【方法】分别用 0.05% Tween-80 水溶液和  $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$  和  $1 \times 10^8$  孢子/mL 的球孢白僵菌孢子悬浮液接种草地贪夜蛾 3 龄幼虫, 第 3、7 及 14 天后观察记录感染情况及死亡虫数; 分别用浸种法、灌根法、叶面喷施法研究球孢白僵菌 Bb378 菌株对玉米的促生性及对草地贪夜蛾取食行为的影响。

【结果】筛选出的高致病性菌株 Bb378 处理草地贪夜蛾 3 龄幼虫 14 d 后累计校正死亡率为 48.61%,  $LC_{50}$  为  $1.11 \times 10^8$  孢子/mL。使用叶面喷施法接种, 球孢白僵菌 Bb378 对玉米叶面积和鲜重的影响最大; 使用灌根法和浸种法接种, Bb378 菌株对株高的影响较为明显; 当 Bb378 浓度为  $1 \times 10^7$  和  $1 \times 10^8$  孢子/mL 时对玉米的促生长效果较为显著。浓度为  $1 \times 10^7$  和  $1 \times 10^8$  孢子/mL 悬浮液浸种对初孵和 3 龄幼虫均具有显著的驱避效果;  $1 \times 10^7$  和  $1 \times 10^8$  孢子/mL 悬浮液灌根对初孵幼虫驱避效果明显, 但对 3 龄幼虫仅在  $1 \times 10^8$  孢子/mL 浓度下有明显作用; 叶面喷施法与对照差异不显著。【结论】球孢白僵菌 Bb378 对草地贪夜蛾具有较高致病性, 接种后促进了玉米生长, 形成的球孢白僵菌 Bb378-玉米共生体可抑制草地贪夜蛾的取食行为, 具有进一步研究和开发的价值。

**关键词** 草地贪夜蛾; 球孢白僵菌 Bb378; 杀虫活性; 促生性; 驱避作用

## Isolation and identification of the *Beauveria bassiana* Bb378 strain and its pathogenicity to *Spodoptera frugiperda*

BI Si-Jia\*\* WU Chen-Yuan HU Ben-Jin XU Li-Na XU Ting-Ting HU Fei\*\*\*

(Institute of Plant Protection and Agro-products Safety, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China)

**Abstract** 【Objectives】To investigate the potential of using the fungus *Beauveria bassiana* to protect maize crops from *Spodoptera frugiperda*, a polyphagous, important, invasive, insect pest, that poses a major threat to agriculture in China.

【Methods】The *Beauveria bassiana* Bb378 strain, which is highly pathogenic to *S. frugiperda*, was isolated and 3rd instar *S. frugiperda* larvae were inoculated with a 0.05% Tween-80 aqueous solution containing either  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ , or  $1 \times 10^8$  conidia/mL of *B. bassiana* spore suspension. The infection rate and number of dead larvae were observed and recorded after 3, 7 and 14 days. Effects of the Bb378 strain on the feeding of *S. frugiperda* on maize were studied by using the seed soaking, root irrigation and foliar spraying methods. 【Results】After 14 days the cumulative corrected mortality and  $LC_{50}$  of the highly pathogenic Bb378 strain were 48.61% and  $1.11 \times 10^8$  conidia/mL, respectively. Spraying the Bb378 strain onto maize foliage increased the leaf area and fresh weight of corn, whereas root irrigation and seed soaking had an obvious effect on plant height. The growth promoting effect of the Bb378 strain was obvious at concentrations of  $1 \times 10^7$  and  $1 \times 10^8$  conidia/mL. Soaking seeds in suspensions of  $1 \times 10^7$  and  $1 \times 10^8$  conidia/mL significantly repelled newly hatched and 3rd instar larvae. Irrigating roots with suspensions of  $1 \times 10^7$  and  $1 \times 10^8$  conidia/mL also had an obvious repellent effect on newly hatched

\*资助项目 Supported projects: 国家重点研发计划项目 (2021YFD1400700); 安徽省自然科学基金 (2008085MC75)

\*\*第一作者 First author, E-mail: 945807651@qq.com

\*\*\*通讯作者 Corresponding author, E-mail: hufly0224@163.com

收稿日期 Received: 2022-09-21; 接受日期 Accepted: 2023-06-13

larvae, but only a concentration of  $1 \times 10^8$  conidia/mL significantly repelled 3rd instar larvae. There was, however, no significant difference between leaf spraying and the control. **[Conclusion]** The Bb378 strain is highly pathogenic to *S. frugiperda*. Applying *B. bassiana* to maize not only promoted plant growth, but also inhibited the feeding behavior of *S. frugiperda*, findings that justify further research and development.

**Key words** *Spodoptera frugiperda*; *Beauveria bassiana* Bb378; insecticidal activity; growth-promoting; repellent effect

草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 是起源于美洲热带和亚热带地区的重大迁飞性农业害虫, 具有食量大、繁殖力强、适生区域广等特点 (Montezano *et al.*, 2018; 石旺鹏, 2020), 自 2019 年 1 月入侵中国云南省以来, 迅速在全国扩散蔓延, 目前已完全定殖 (姜玉英等, 2019; 杨学礼等, 2019)。化学农药是现阶段防治草地贪夜蛾的应急措施, 在短期内可以有效抑制其种群增长, 减少为害损失。但随着化学农药的长期大量使用, 草地贪夜蛾的抗药性必然进一步增强, 防治难度也会不断扩大, 我国对其防控策略亟需从应急化学防治向可持续的绿色生物防治发展 (李永平等, 2019; Liu *et al.*, 2019; 吴孔明, 2020)。

以昆虫病原真菌为主的生物农药是害虫生物防治的一种有效手段, 具有环境友好、害虫不易产生抗性等特点, 有较高的应用价值和前景 (Lacey *et al.*, 2015)。球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 作为一种广谱性昆虫病原真菌, 是国内外最常用的生防菌之一 (李增智等, 2011), 它既可以从昆虫的体壁、节间膜或呼吸道、消化道等部位直接侵染昆虫, 还能通过灌根、浸种、喷施叶片等方式定殖到植物体内, 形成共生体, 在促进植物生长的同时降低害虫为害 (林海萍等, 2008; Ownley *et al.*, 2008)。Qin 等 (2021) 研究表明球孢白僵菌作为内生菌导入烟草后, 不仅促进了烟草的生长, 还增强了对植物病原细菌、真菌及蚜虫的抗性。隋丽等 (2020) 采用灌根法和浸种法将球孢白僵菌成功定殖至玉米植株上, 亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 幼虫对球孢白僵菌-玉米共生体的取食率显著低于对照, 取食行为表现出明显的抑制及忌避现象。

然而, 由于球孢白僵菌不同菌株之间生物学活性差异较大, 且具有寄主专化性, 筛选针对靶标害虫的优势菌株是开展防治的前提条件。因此

本研究从筛选对草地贪夜蛾高毒力的球孢白僵菌入手, 评价菌株的生物学特性和杀虫活性, 同时采取灌根、浸种、叶面喷施方法将球孢白僵菌接种至玉米植株上, 构建球孢白僵菌-玉米共生体, 进一步探讨球孢白僵菌作用至植株内部后对植株生长指标的影响和对草地贪夜蛾的驱避效果, 以期更好地了解球孢白僵菌防治草地贪夜蛾的实际应用价值, 并为草地贪夜蛾的绿色防控之路提供新参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试虫源、菌株及玉米

草地贪夜蛾实验室种群, 于 2019 年采集自安徽省黄山市春玉米田, 在实验室以人工饲料饲养, 饲养过程中未接触任何杀虫剂, 饲养条件为温度 ( $27 \pm 1$ ) °C, 相对湿度 65%-85%, 光周期 14L : 10D。选择生长发育整齐一致的 3 龄幼虫为供试虫源。

5 株球孢白僵菌分离自安徽阜阳太和田间采集的草地贪夜蛾僵虫。培养条件为温度 25 °C, 光周期 14L : 10D。

供试玉米品种为郑单 958, 购于安徽省种子大市场。

### 1.2 球孢白僵菌分离纯化及菌株筛选

将采集到的 5 头草地贪夜蛾僵虫在 75%酒精中浸泡 2-3 s, 用无菌水冲洗 2 遍, 放在垫有湿润滤纸的培养皿中, 于 25 °C 下培养至产孢。在超净台里挑取僵虫表面的孢子粉于 SDAY 培养基中划线培养 3-5 d, 继续挑取干净的球孢白僵菌菌体接至新培养基上, 直至无杂菌污染。取适量孢子送生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行 18S rDNA 测序, 将测得序列在 NCBI 基因

数据库中进行同源性比对。

将分离纯化得到的 5 株球孢白僵菌分别接种至 SDAY 培养基上 14 d 后, 将孢子粉刮至 0.05% Tween-80 水溶液中, 配置成  $1 \times 10^7$  孢子/mL 孢悬液, 采用浸虫法将大小一致的草地贪夜蛾 3 龄幼虫浸入孢悬液 10 s, 用无菌滤纸吸去多余水分, 接入装有饲料的 12 孔板, 以浸泡 0.05% Tween-80 水溶液处理为对照。14 d 后观察记录感染情况及死亡虫数, 并计算僵虫率和校正死亡率, 选择高毒力的菌株进行下一步试验。

校正死亡率 (%) =

$$\frac{\text{处理虫口减退率} - \text{对照虫口减退率}}{1 - \text{对照虫口减退率}} \times 100.$$

### 1.3 球孢白僵菌 Bb378 的生物学活性及致病力测定

将 Bb378 接种在铺有玻璃纸的 SDAY 培养基上, 14 d 后将孢子粉刮至 0.05% Tween-80 水溶液中, 配制成所需浓度, 参照赵薇 (2019) 的方法对菌株的生长速率 ( $1 \times 10^3$  孢子/mL)、产孢量 ( $1 \times 10^5$  孢子/mL) 和萌发率 ( $1 \times 10^6$  孢子/mL) 进行测定。同时, 将 Bb378 用 0.05% Tween-80 水溶液配制成  $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$  和  $1 \times 10^8$  孢子/mL 共 5 个浓度进行致病力测定, 方法同 1.2, 以浸泡 0.05% Tween-80 水溶液的处理为对照, 第 3、7 及 14 天后观察记录感染情况及死亡虫数, 计算毒力回归方程。每个处理 24 头幼虫, 重复 3 次。

### 1.4 球孢白僵菌 Bb378 对玉米生长的影响

选择颗粒饱满的玉米种子, 经 5% 次氯酸钠表面消毒备用。用 0.05% Tween-80 水溶液将 Bb378 配制成  $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$  和  $1 \times 10^8$  孢子/mL 共 3 个浓度的孢子悬浮液, 以 0.05% Tween-80 水溶液为对照。分别用浸种法、灌根法、叶面喷施法研究 Bb378 对玉米生长的促进作用。(1) 浸种法: 将玉米种子在不同浓度的球孢白僵菌 Bb378 孢悬液及对照中浸泡 12 h, 用无菌滤纸吸干表面水分后播种, 每盆播种 3 粒, 待玉米出苗后每盆保留 1 株长势一致的玉米苗, 其余的拔除。(2) 灌根法: 每盆播种 3 粒玉米, 待玉米出苗后每盆

保留 1 株长势一致的玉米苗, 其余的拔除, 齐苗后第 7 天分别将 20 mL 不同浓度的球孢白僵菌孢悬液及对照浇灌至玉米根部。(3) 叶面喷施法: 播种方法同 (2), 齐苗后第 7 天用锡纸遮盖土壤基质, 并用喷雾器分别将 20 mL 不同浓度的球孢白僵菌 Bb378 孢悬液及对照均匀喷洒至叶片表面。玉米齐苗后第 14 天和第 21 天分别测量玉米的叶面积及株高, 并于第 21 天测量玉米植株鲜重, 比较不同接种方式对玉米生长的影响, 每处理 5 盆玉米, 重复 3 次。

### 1.5 球孢白僵菌 Bb378-玉米共生体对草地贪夜蛾的驱避效果

用打孔器将 1.4 培育的玉米叶片和茎秆打成直径 1 cm 的材料, 对草地贪夜蛾初孵幼虫和 3 龄幼虫进行非选择性及选择性试验。

**1.5.1 非选择性试验** 将无菌滤纸打湿后放入培养皿中, 在四周均匀放置各处理的直径 1 cm 的共生体叶片 8 片 (3 龄幼虫使用 0.5 cm 厚, 直径 1 cm 的共生体茎秆薄片 5 片), 使各叶片与培养皿中心距离相等, 在中心接入 8 头草地贪夜蛾初孵幼虫或 5 头 3 龄幼虫, 用黑色棉布遮盖培养皿, 放入养虫室饲养, 每处理 4 个培养皿, 重复 3 次。分别在接虫 1、2、4、6、8、10、12、24、36 及 48 h 后记录草地贪夜蛾幼虫所在位置和数量, 计算草地贪夜蛾在不同处理下对叶片或茎秆的取食率。

**1.5.2 选择性试验** 将无菌滤纸划分成相等面积的 4 个部分, 分别放置 3 个浓度处理下的共生体材料和对照玉米材料各 1 片, 在培养皿中心接入 8 头草地贪夜蛾初孵幼虫或 5 头 3 龄幼虫, 用黑色棉布遮盖培养皿, 放入养虫室饲养, 每处理 4 个培养皿, 重复 3 次。分别在接虫 1、2、4、6、8、10、12、24、36 及 48 h 后记录草地贪夜蛾幼虫所在位置和数量, 计算草地贪夜蛾在不同处理下对叶片或茎秆的取食率。

### 1.6 数据统计与分析

使用 PoloPlus 软件计算球孢白僵菌毒力回归方程及  $LC_{50}$ , 利用 SPSS 软件对数据进行描述性统计及方差齐性检测, 并采用 Duncan's 方法

进行多重比较及显著性分析,利用 Sigmaplot14.0 软件做图。

2 结果与分析

2.1 菌株分离纯化

在体视镜下观察采集到的 5 头僵虫,可以明显看出虫体头部有“Y”字纹路(图 1: A),虫

体尾部具有平行的 4 个斑点(图 1: B),基本符合草地贪夜蛾的形态特征。将僵虫保湿培养后产生孢子粉,对其进行分离纯化后得到单一的白色菌落,绒毛致密(图 1: C),在光学显微镜下菌丝呈梗状,分生孢子呈透明球状(图 1: D),符合球孢白僵菌特征,随后进行了 18S rDNA 鉴定证实分离纯化得到的 5 株菌株为球孢白僵菌,分别命名为 Bb357、Bb358、Bb362、Bb378 和 Bb385。

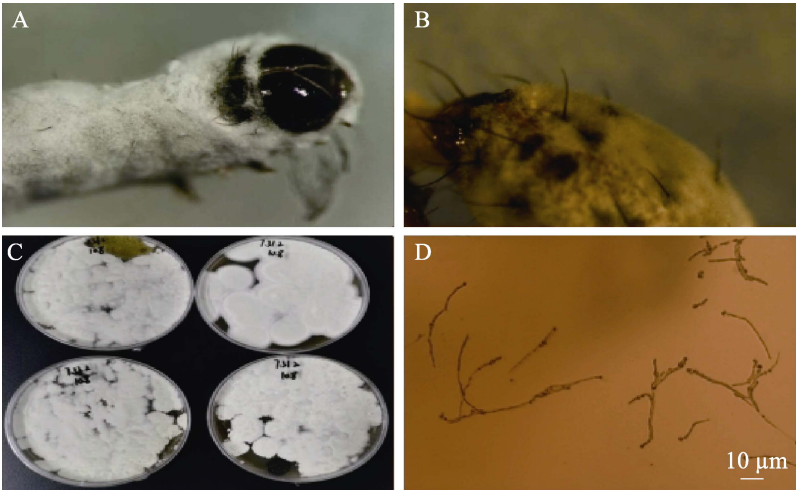


图 1 菌株的分离纯化  
Fig. 1 Isolation and purification of strain

A. 头部形态; B. 尾部形态; C. 纯化后的白僵菌; D. 菌丝和孢子。  
A. Head morphology; B. Tail morphology; C. Purified *Beauveria bassiana*; D. Mycelium and spores.

2.2 高毒力菌株筛选

5 株菌株对草地贪夜蛾幼虫的致病力测定结果(表 1)表明,大部分菌株对草地贪夜蛾的致病力低,Bb378 致病力较好,校正死亡率为 46.1%,僵虫率为 22.2%,可用于下一步试验。

表 1 5 株菌株对草地贪夜蛾致病力测定  
Table 1 Pathogenicity determination of 5 strains against *Spodoptera frugiperda*

| 菌株<br>Strains | 校正死亡率(%)<br>Adjusted mortality (%) | 僵虫率(%)<br>Cadaver rates (%) |
|---------------|------------------------------------|-----------------------------|
| Bb357         | 5.6                                | 0.0                         |
| Bb358         | 2.8                                | 0.0                         |
| Bb362         | 2.8                                | 0.0                         |
| Bb378         | 46.1                               | 22.2                        |
| Bb385         | 19.4                               | 8.3                         |

2.3 球孢白僵菌 Bb378 的生物学活性

接菌后第 7 天,球孢白僵菌 Bb378 的菌落生长直径达 19.92 mm,日均增长量为 2.85 mm/d,平均产孢量为  $1.66 \times 10^8$  个/皿,萌发率为 92.86%(表 2)。

2.4 球孢白僵菌 Bb378 对草地贪夜蛾幼虫的致病力

5 种浓度的球孢白僵菌 Bb378 对草地贪夜蛾致病力测定结果如表 3 所示,试虫的累计校正死亡率随着处理时间和浓度的增加而升高,在  $1 \times 10^8$  孢子/mL 浓度下死亡率最高,14 d 时草地贪夜蛾感染 Bb378 的累计校正死亡率为 48.61%。

利用 PoloPlus 软件对 Bb378 的毒力进行分析,得到 Bb378 的毒力回归方程为  $Y = 3.06 + 0.24X$ ,  $LC_{50} = 1.11 \times 10^8$  孢子/mL,  $F_{(0.01)} = 34.12$ ,  $\chi^2_{(0.01)} = 11.34$ ,结果可信。

表 2 Bb378 生物学特征

Table 2 The biological characteristics of Bb378 strain

| 菌落生长直径 (mm) Colony growth diameter (mm) |              |              | 日均增长量 (mm/d)                | 平均产孢量 (个/皿)                     | 萌发率 (%)              |
|-----------------------------------------|--------------|--------------|-----------------------------|---------------------------------|----------------------|
| 3 d                                     | 5 d          | 7 d          | Average daily growth (mm/d) | Average sporulation (ind./dish) | Germination rate (%) |
| 12.41 ± 0.55                            | 15.42 ± 0.44 | 19.92 ± 0.24 | 2.85 ± 0.03                 | 1.66 × 10 <sup>8</sup> ± 0.17   | 92.86                |

表 3 白僵菌 Bb378 对草地贪夜蛾 3 龄幼虫的感染致病力

Table 3 The virulence of Bb378 strain to the third instar larvae of *Spodoptera frugiperda*

| 浓度×10 <sup>6</sup> 孢子 (mL)<br>Concentration ×10 <sup>6</sup><br>conidia (mL) | 试虫数<br>Number | 累计死亡率 (%)<br>Cumulative mortality (%) |       |       | 累计校正死亡率 (%)<br>Cumulative adjusted mortality (%) |       |       |
|------------------------------------------------------------------------------|---------------|---------------------------------------|-------|-------|--------------------------------------------------|-------|-------|
|                                                                              |               | 3 d                                   | 7 d   | 14 d  | 3 d                                              | 7 d   | 14 d  |
| 100                                                                          | 72            | 33.33                                 | 41.67 | 50.00 | 31.48                                            | 40.05 | 48.61 |
| 10                                                                           | 72            | 30.56                                 | 33.33 | 44.44 | 28.63                                            | 31.48 | 42.90 |
| 1                                                                            | 72            | 22.22                                 | 27.78 | 30.56 | 20.06                                            | 25.78 | 28.63 |
| 0.1                                                                          | 72            | 19.44                                 | 22.22 | 25.00 | 17.20                                            | 20.06 | 22.92 |
| 0.01                                                                         | 72            | 16.67                                 | 19.44 | 19.44 | 14.36                                            | 17.20 | 17.20 |
| 对照 CK                                                                        | 72            | 2.70                                  | 2.70  | 2.70  | —                                                | —     | —     |

2.5 球孢白僵菌 Bb378 不同浓度和接种方式对玉米株高的影响

球孢白僵菌 Bb378 处理组玉米株高均高于对照组 (图 2)。接种后第 14 天, 浸种法对玉米的促生长作用最明显, 1 × 10<sup>8</sup> 孢子/mL 浓度下株高达到 51.35 cm, 较对照显著增长了 13.73% (图 2: A); 灌根法次之, 在 1 × 10<sup>7</sup> 孢子/mL 浓度下株高为 50.23 cm, 较对照显著增长了 11.00%

(图 2: B); 在叶面喷施法中, 3 种浓度处理的玉米株高较对照也有所增长, 但差异不显著 (图 2: C)。在接种后第 21 天, 叶面喷施法下玉米株高增长最明显, 在 1 × 10<sup>7</sup> 孢子/mL 浓度下株高最高, 为 68.18 cm, 较对照显著增长了 11.29% (图 2: C); 在浸种处理中, 虽然 1 × 10<sup>7</sup> 孢子/mL 浓度下株高达到 67.71 cm, 高于灌根法的 60.78 cm, 但与对照相比差异不显著 (图 2: A, B)。

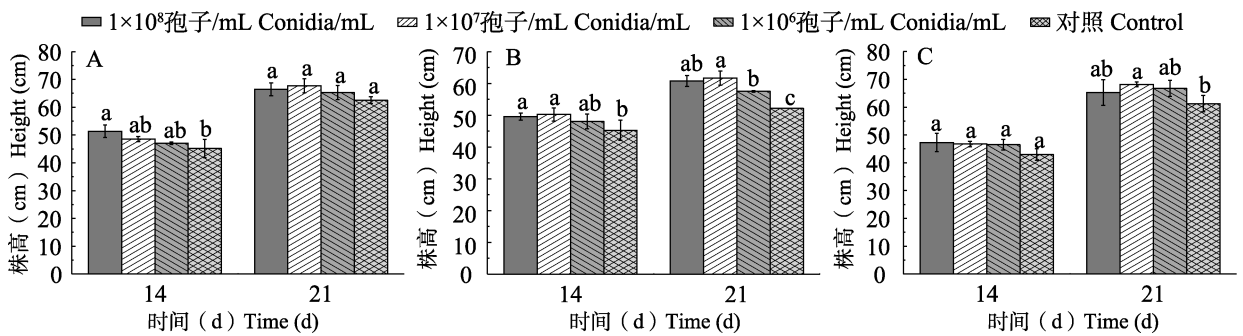


图 2 球孢白僵菌 Bb378 不同施用方式对玉米株高的影响

Fig. 2 Effects of Bb378 strain inoculated with different methods on the plant height of corn

A. 浸种; B. 灌根; C. 叶面喷施。

A. Seed soaking; B. Root irrigation; C. Foliage spray.

数据为平均值 ± 标准差, 柱上标有不同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,  $P < 0.05$ )。下图同。

Data in the figure are mean ± SD, Histograms with different lowercase letters indicate significant differences at the same time or the same treatment at the 0.05 level (Duncan's multiple range test,  $P < 0.05$ ). The same below.

## 2.6 球孢白僵菌 Bb378 不同浓度和接种方式对玉米叶面积的影响

如图 3 所示,处理组的玉米叶面积与对照相比均有明显的增长。球孢白僵菌 Bb378 接种后第 14 天,灌根法对玉米叶面积的促进作用最明显,  $1 \times 10^8$  孢子/mL 浓度下叶面积达到  $213.31 \text{ cm}^2$ , 较对照显著增长了 28.67%, 差异显著 (图 3: B); 浸种法次之, 在  $1 \times 10^8$  孢子/mL 的浓度下叶面积为  $196.73 \text{ cm}^2$ ,

较对照显著增长了 53.63% (图 3: A); 在叶面喷施法中, 3 种浓度处理的玉米叶面积较对照也有所增长, 但差异不明显 (图 3: C)。接种后第 21 天, 叶面喷施法下玉米叶面积增长最明显, 在  $1 \times 10^7$  孢子/mL 浓度下叶面积最大, 为  $529.43 \text{ cm}^2$ , 较对照显著增长了 42.01% (图 3: C); 在浸种处理中,  $1 \times 10^8$  孢子/mL 浓度下叶面积为  $382.01 \text{ cm}^2$ , 较对照显著增长了 34.51% (图 3: A); 在灌根法下虽然各浓度与对照相比叶面积均有所增长, 但与对照相比差异不显著 (图 3: B)。

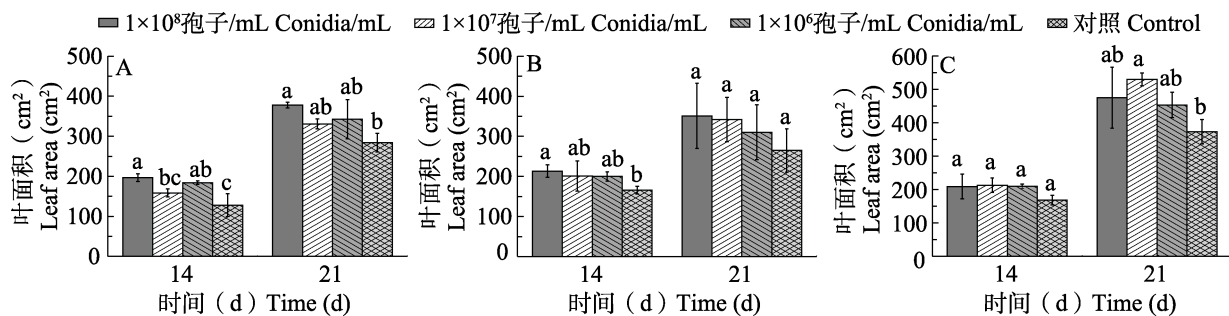


图 3 球孢白僵菌 Bb378 不同施用方式对玉米叶面积的影响

Fig. 3 Effects of Bb378 strain inoculated with different methods on the leaf area of corn

A. 浸种; B. 灌根; C. 叶面喷施。

A. Seed soaking; B. Root irrigation; C. Foliage spray.

## 2.7 球孢白僵菌 Bb378 不同浓度和接种方式对玉米植株鲜重的影响

如图 4 所示,球孢白僵菌 Bb378 处理对玉米鲜重的影响趋势与叶面积相近, 叶面喷施处理

中玉米鲜重最高, 在  $1 \times 10^7$  孢子/mL 浓度下达到 46.23 g, 但由于对照在该接种方式鲜重亦增加较多, 故二者差异不显著。浸种法中玉米鲜重次之, 在  $1 \times 10^8$  孢子/mL 浓度下重 26.73 g, 较对照显著增长了 52.11%; 在灌根处理中, 玉米鲜重较对照增长幅度最大, 在  $1 \times 10^8$  孢子/mL 浓度下玉米鲜重较对照显著增长了 72.27%, 重 26.11 g。

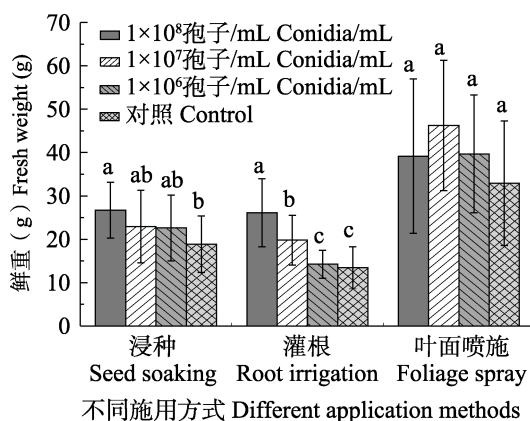


图 4 球孢白僵菌 Bb378 不同施用方式对玉米鲜重的影响

Fig. 4 Effects of Bb378 strain inoculated with different methods on the fresh weight of corn

## 2.8 球孢白僵菌 Bb378-玉米共生体对草地贪夜蛾的驱避效果

### 2.8.1 初孵幼虫非选择性试验

不同接种方式下草地贪夜蛾初孵幼虫对球孢白僵菌 Bb378-玉米共生体的取食率均表现出随着时间的延长而下降的趋势, 且各处理不同浓度间的比较发现, 初孵幼虫对共生体的取食率均在  $1 \times 10^8$  孢子/mL 时最低 (图 5)。

不同接种方式下初孵幼虫的取食率与对照

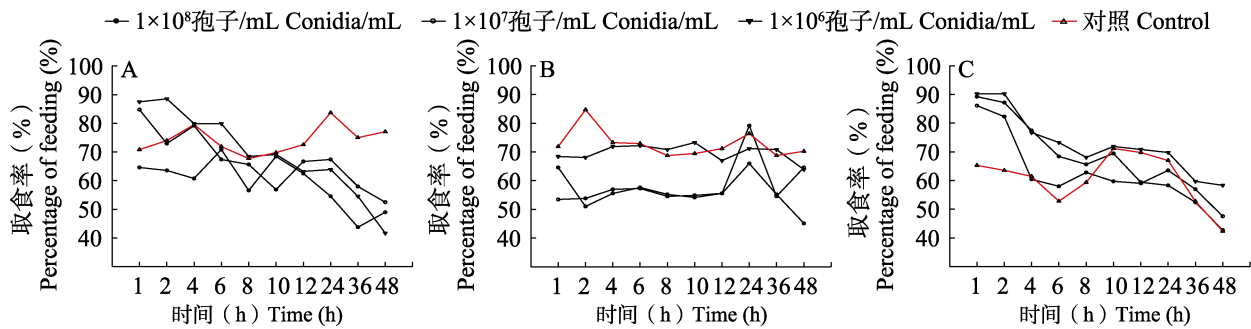


图5 初孵幼虫对不同处理方式玉米材料的取食率

Fig. 5 Feeding rate of newly hatched larvae on maize materials with different treatments

A. 浸种; B. 灌根; C. 叶面喷施。

A. Seed soaking; B. Root irrigation; C. Foliage spray.

相比差异最大的浓度和处理时间分别为: 浸种法浓度为  $1 \times 10^8$  孢子/mL、处理时间为 36 h 时草地贪夜蛾取食率为 43.75%, 对照为 75.00%, 下降最明显 (图 5: A); 灌根法浓度为  $1 \times 10^8$  孢子/mL、处理时间为 2 h 时草地贪夜蛾取食率为 51.04%, 对照为 84.72%, 下降最明显 (图 5: B); 叶面喷施法浓度为  $1 \times 10^7$  孢子/mL、处理时间为 10 h 时草地贪夜蛾取食率为 61.24%, 对照为 72.56%, 下降最明显 (图 5: C)。对比 3 种接种方式, 初孵幼虫对浸种、灌根处理中  $1 \times 10^7$  和  $1 \times 10^8$  孢子/mL 浓度的平均取食率均显著低于对照,  $1 \times 10^6$  孢子/mL 的平均取食率与对照差异较小, 而在叶面喷施处理的 3 种浓度下与对照相比均没有显著差异, 对初孵幼虫均无明显的驱避作用。

**2.8.2 3 龄幼虫非选择性试验** 不同处理中 3 龄幼虫的取食率均随时间的改变而呈现上下波动

的情况 (图 6), 在浸种处理中, 3 龄幼虫对  $1 \times 10^7$  和  $1 \times 10^8$  孢子/mL 球孢白僵菌 Bb378-玉米共生体的平均取食率显著低于对照 (图 6: A); 在灌根处理中, 草地贪夜蛾的取食率在 3 种浓度处理下与对照相比均存在显著差异 (图 6: B); 在叶面喷施处理中, 草地贪夜蛾取食率仅在  $1 \times 10^8$  孢子/mL 较对照显著降低 (图 6: C)。

不同接种方式下 3 龄幼虫的取食率与对照相比差异最大的浓度和处理时间分别为: 浸种法浓度为  $1 \times 10^8$  孢子/mL、处理时间为 1 h 时草地贪夜蛾的取食率为 3.33%, 对照为 65%, 下降最明显 (图 6: A); 灌根法浓度为  $1 \times 10^8$  孢子/mL、处理时间为 2 h 时草地贪夜蛾的取食率为 13.87%, 对照为 60.60%, 下降最明显 (图 6: B); 叶面喷施法浓度为  $1 \times 10^8$  孢子/mL、处理时间为 2 h 时草地贪夜蛾的取食率为 12.20%, 对照为 66.07%, 下降最明显 (图 6: A)。

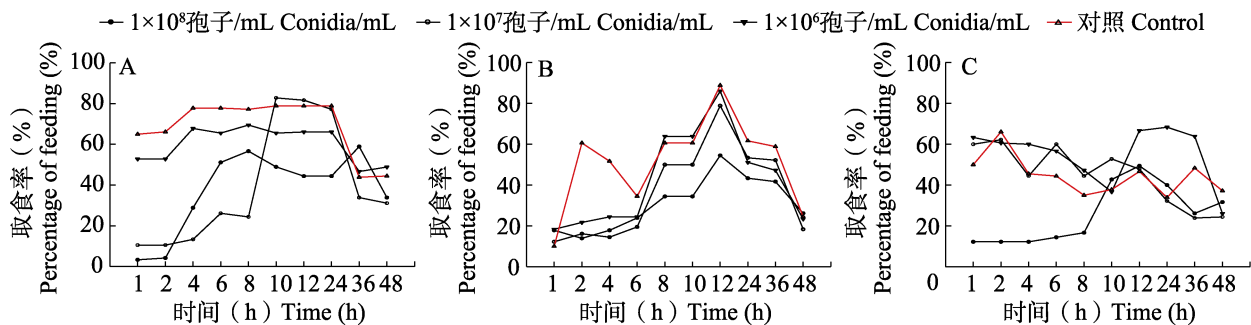


图6 3 龄幼虫对不同处理方式玉米材料的取食率

Fig. 6 Feeding rate of the third instar larvae on maize materials with different treatments

A. 浸种; B. 灌根; C. 叶面喷施。

A. Seed soaking; B. Root irrigation; C. Foliage spray.

**2.8.3 初孵幼虫选择性试验** 不同接种方式下初孵幼虫对共生体的取食情况如图 7 所示, 在浸种与灌根处理中, 初孵幼虫对  $1 \times 10^7$  孢子/mL 和  $1 \times 10^8$  孢子/mL 的球孢白僵菌 Bb378-玉米共生体的取食率与对照相比均显著下降 (图 7: A, B), 其中在灌根处理中, 当浓度为  $1 \times 10^8$  孢子/mL 时, 初孵幼虫的取食率从 1 h 至 48 h 与对照相比均存在显著差异; 当浓度为  $1 \times 10^6$  孢子/mL 和  $1 \times 10^7$  孢子/mL 时, 初孵幼虫的取食率仅在 10 h 至 36 h 间较对照显著降低 (图 7: B)。在叶面喷施处理中, 初孵幼虫对共生体的取食率仅在浓度为  $1 \times 10^7$  孢子/mL 和  $1 \times 10^8$  孢子/mL、

处理时间为 1 h 与 4 h 时较对照显著降低 (图 7: C)。

不同接种方式下初孵幼虫的取食率与对照相比, 差异最大的浓度和处理时间分别为浸种法浓度为  $1 \times 10^7$  孢子/mL、处理时间为 1 h 时草地贪夜蛾取食率为 6.25%, 对照为 49.67%, 下降最明显 (图 7: A); 灌根法浓度为  $1 \times 10^8$  孢子/mL、处理时间为 24 h 时草地贪夜蛾取食率为 8.64%, 对照为 38.23%, 下降最明显 (图 7: B); 叶面喷施法浓度为  $1 \times 10^7$  孢子/mL、处理时间为 1 h 时草地贪夜蛾取食率为 7.35%, 对照为 26.71%, 下降最明显 (图 7: C)。

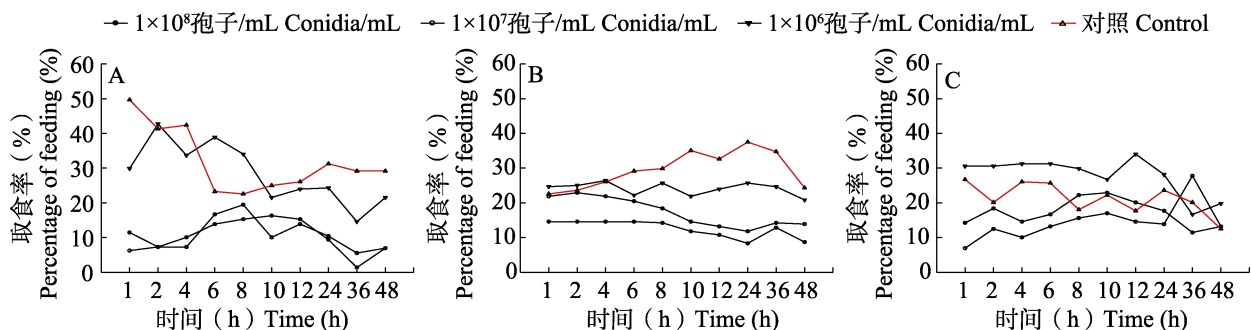


图 7 初孵幼虫取食不同处理方式玉米材料的选择性结果

Fig. 7 Selectivity of newly hatched larvae feeding on maize materials with different treatments

A. 浸种; B. 灌根; C. 叶面喷施。

A. Seed soaking; B. Root irrigation; C. Foliage spray.

**2.8.4 3 龄幼虫选择性试验** 不同接种方式下 3 龄幼虫对孢白僵菌 Bb378 玉米共生体的取食情况如图 8 所示, 在浸种处理后 1-8 h, 3 龄幼虫对共生体的取食率显著低于对照, 并随着时间的延

长差异逐渐减小 (图 8: A); 在灌根处理中, 草地贪夜蛾的取食率仅在处理后 4-6 h 与对照相比均存在显著差异 (图 8: B); 在叶面喷施处理中, 草地贪夜蛾取食率在处理 4 h、12-24 h 较对照

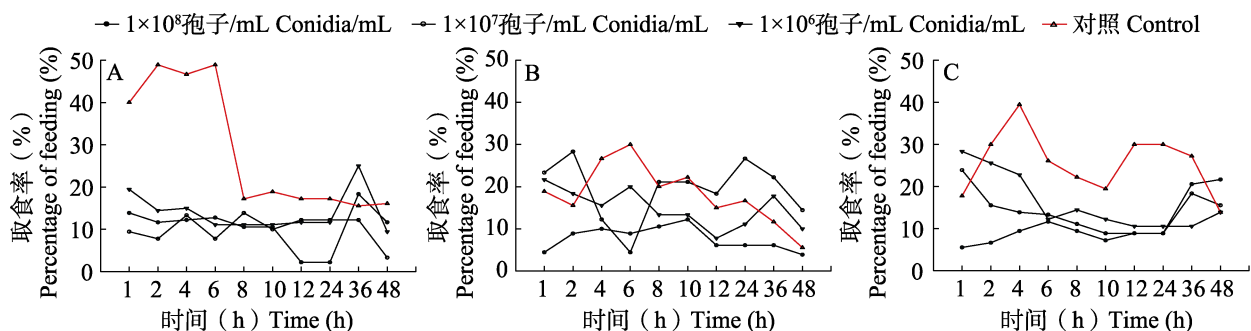


图 8 3 龄幼虫取食不同处理方式玉米材料的选择性结果

Fig. 8 Selectivity of the third instar larvae feeding on maize materials with different treatments

A. 浸种; B. 灌根; C. 叶面喷施。

A. Seed soaking; B. Root irrigation; C. Foliage spray.

显著降低, 在 4-12 h、24-48 h 间差异逐渐减少 (图 8: C)。

不同接种方式下 3 龄幼虫的取食率与对照相比, 差异最大的浓度和处理时间分别为浸种法浓度为  $1 \times 10^7$  孢子/mL、处理时间为 2 h 与 6 h 时草地贪夜蛾取食率为 7.78%, 对照为 48.89%, 下降最明显 (图 8: A); 灌根法浓度为  $1 \times 10^7$  孢子/mL、处理时间为 6 h 时草地贪夜蛾取食率为 8.89%, 对照为 30.00%, 下降最明显 (图 8: B); 叶面喷施法浓度为  $1 \times 10^8$  孢子/mL、处理时间为 4 h 时草地贪夜蛾取食率为 9.44%, 对照为 39.44%, 下降最明显 (图 8: C)。

### 3 小结与讨论

球孢白僵菌作为一种优良的生防菌, 具有致病性强、寄主范围广、生产成本低、无环境污染等特点, 被广泛用于农林业病虫害防治 (刘玉军等, 2008)。但由于球孢白僵菌有着丰富的遗传多样性及一定的寄主专一性, 筛选出对防治靶标高毒高效的菌株是应用的基础。程茵等 (2022) 从土壤中分离出 3 株球孢白僵菌, 对粘虫 *Mythimna separata* 进行了致病力测定, 结果发现相较于其他两种菌株, 球孢白僵菌 Z-G2-5 致病力更高、致死速度更快, 具有较好的研究和应用价值。Cruz-Avalos 等 (2019) 比较了 7 株球孢白僵菌对草地贪夜蛾的毒力, 结果表明 Bb9 在  $1 \times 10^8$  孢子/mL 浓度下对初孵幼虫的致死率达 100%, 而 Bb40 仅有 19%。本研究测定了 5 株球孢白僵菌在  $1 \times 10^7$  孢子/mL 浓度下对草地贪夜蛾 3 龄幼虫的致病力, 大部分菌株的毒力较低, 仅 Bb378 效果较好, 校正死亡率为 48.61%, 这证明了不同菌株对同一防治靶标的毒力存在显著的差异。

球孢白僵菌除了可直接作用于靶标昆虫, 还可以在植株中内生定殖。Gurulingappa 等 (2010) 研究发现球孢白僵菌可以在棉花中成功定殖, 并且内生菌可以显著降低棉蚜 *Aphis gossypii* 的繁殖能力。Akello 等 (2008) 通过浸根法将球孢白僵菌接种至香蕉苗上, 香蕉象甲 *Cosmopolites sordidus* 取食后存活率显著降低, 植株损伤也大

幅下降。魏世誉等 (2015) 研究证明了当使用浓度为  $1 \times 10^4$ - $1 \times 10^7$  孢子/mL 的球孢白僵菌定殖玉米后, 玉米的促生效果和抗虫性能都显著增强, 且  $1 \times 10^7$  孢子/mL 为最适浓度。本研究比较了球孢白僵菌 Bb378 不同浓度和不同接种方式对玉米生长的影响及对草地贪夜蛾的驱避作用, 结果表明 3 种接种方式对玉米均具有一定的促生长作用, 叶面喷施法对玉米叶面积、鲜重的促生长作用最明显; 灌根法及浸种法对玉米株高促生长作用相对较明显, 但三者差异不显著。玉米出苗前期植株的生长营养主要由根部供给, 因此灌根法及浸种法对株高的促生长作用明显, 而叶面喷施法球孢白僵菌 Bb378 直接作用于玉米叶片, 叶面积增长最明显, 同时玉米叶片作为光合作用的主要部位, 为玉米积累有机物, 从而增加鲜重, 但由于 3 种接种方式下玉米生长时期略有差别, 对玉米促生长作用还需要进一步研究。

此外, 从孢白僵菌 Bb378-共生体对草地贪夜蛾幼虫的选择性及非选择性试验可以看出, 浸种法在  $1 \times 10^7$  及  $1 \times 10^8$  孢子/mL 浓度下对初孵和 3 龄幼虫均具有显著的驱避效果; 灌根法在  $1 \times 10^7$  及  $1 \times 10^8$  孢子/mL 浓度下对初孵幼虫驱避效果明显, 但对 3 龄幼虫仅在  $1 \times 10^8$  孢子/mL 浓度下有明显作用; 叶面喷施法仅在高浓度下对草地贪夜蛾幼虫有一定驱避效果但相比对照差异不显著。综上所述, 本研究证明了球孢白僵菌不同菌株对草地贪夜蛾的毒力存在显著差异, 且球孢白僵菌可以在玉米中成功定殖, 一方面促进玉米的生长, 另一方面提高玉米的抗虫性, 为内生菌在生物防治中的应用提供了新的依据, 未来还需进一步研究相关的作用机制, 更深层次地探索球孢白僵菌防治草地贪夜蛾的机理, 更好地辅助生产实践。

### 参考文献 (References)

- Akello J, Dubois T, Coyne D, Kyamanywa S, 2008. Endophytic *Beauveria bassiana* in banana (*Musa* spp.) reduces banana weevil (*Cosmopolites sordidus*) fitness and damage. *Crop Protection*, 27(11): 1437-1441.
- Cheng Y, Zheng JY, Wang D, 2022. Isolation and identification of three *Beauveria bassiana* isolates and their virulence against

- Mythimna separata* under laboratory condition. *Chinese Journal of Biological Control*, 38(2): 521–530. [程茵, 郑贵阳, 王敦, 2022. 三株球孢白僵菌的分离鉴定与其对粘虫的室内毒力. 中国生物防治学报, 38(2): 521–530.]
- Cruz-Avalos AM, Bivián-Hernández MLÁ, Ibarra JE, Del Rincón-Castro MC, 2019. High virulence of mexican entomopathogenic fungi against fall armyworm, (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 112(1): 99–107.
- Gurulingappa P, Sword GA, Murdoch G, McGee PA, 2010. Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when in planta. *Biological Control*, 55(1): 34–41.
- Jiang YY, Liu J, Zhu XM, 2019. Occurrence and trend of *Spodoptera frugiperda* invasion in China. *China Plant Protection*, 39(2): 33–35. [姜玉英, 刘杰, 朱晓明, 2019. 草地贪夜蛾侵入我国的发生动态和未来趋势分析. 中国植保导刊, 39(2): 33–35.]
- Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel MS, 2015. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132: 1–41.
- Li YP, Zhang S, Wang XJ, Xie XP, Liang P, Zhang L, Gu SH, Gao XW, 2019. Current status of insecticide resistance in *Spodoptera frugiperda* and strategies for its chemical control. *Plant Protection*, 45(4): 14–19. [李永平, 张帅, 王晓军, 解晓平, 梁沛, 张雷, 谷少华, 高希武, 2019. 草地贪夜蛾抗性现状及化学防治策略. 植物保护, 45(4): 14–19.]
- Li ZZ, Huang B, Chen MJ, Wang B, Fan MZ, 2011. Studies on the genus *Beauveria* in molecular era. *Mycosystema*, 30(6): 823–835. [李增智, 黄勃, 陈名君, 王滨, 樊美珍, 2011. 分子时代的白僵菌研究. 菌物学报, 30(6): 823–835.]
- Lin HP, Wei JY, Mao SF, Chen X, Zhang LQ, Ma LJ, 2008. Correlation between protease, chitinase and lipase activities and virulence of *Beauveria bassiana* against *Monochamus alternates*. *Chinese Journal of Biological Control*, 24(3): 290–292. [林海萍, 魏锦瑜, 毛胜凤, 陈喜, 张立钦, 马良进, 2008. 球孢白僵菌蛋白酶、几丁质酶、脂肪酶活性与其毒力相关性. 中国生物防治, 24(3): 290–292.]
- Liu H, Lan TM, Fang DM, Gui FR, Wang HL, Guo W, Chen XF, Chang Y, He SQ, Lü LH, Sahu SK, Chen L, Li HM, Liu P, Fan GY, Liu TX, Hao RS, Lv LH, Chen B, Zhu SS, Huang FN, Dong W, Dong Y, Lu ZH, Kang L, Yang HM, Shen J, Zhu YQ, Liu X, 2019. Chromosome level draft genomes of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), an alien invasive pest in China. *Biorxiv*, <https://doi.org/10.1101/671560>.
- 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.]
- Montezano DG, Specht A, Sosa-Gómez DR, Roque-Specht VF, Sousa-Silva JC, Paula-Moraes SV, Perterson JA, Hunt TE, 2018. Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the America. *African Entomology*, 26(2): 286–301.
- Ownley BH, Griffin MR, Klingeman WE, Gwinn KD, Moulton JK, Pereira RM, 2008. *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(3): 267–270.
- Qin X, Zhao X, Huang SS, Deng J, Li XB, Luo ZB, Zhang YJ, 2021. Pest management via endophytic colonization of tobacco seedlings by the insect fungal pathogen *Beauveria bassiana*. *Pest Management Science*, 77(4): 2007–2018.
- Shi WP, 2020. How greedy are the fall armyworm? *Journal of Plant Protection*, 47(4): 687–691. [石旺鹏, 2020. 草地贪夜蛾到底有多“贪”. 植物保护学报, 47(4): 687–691.]
- Sui L, Xu WJ, Zhu H, Zhang ZK, Fei HQ, Chen RZ, Wang YZ, Li QY, Lu Y, 2020. Effects of *Beauveria bassiana*-com endophytic symbionts on feeding behavior of the Asian corn borer *Ostrinia furnacalis*. *Chinese Journal of Biological Control*, 36(1): 46–51. [隋丽, 徐文静, 朱慧, 张正坤, 费泓强, 陈日翌, 汪洋洲, 李启云, 路杨, 2020. 球孢白僵菌-玉米共生体对亚洲玉米螟取食行为的影响. 中国生物防治学报, 36(1): 46–51.]
- Wei SY, Wang J, Sui L, Li QY, Zheng ZK, Zhang JS, Lu Y, Zhao Y, Zhang YM, Xu WJ, 2015. The colonization of *Beauveria Bassinana* in maize. *Natural Sciences Journal of Harbin Normal University*, 31(6): 122–126. [魏世誉, 王娟, 隋丽, 李启云, 张正坤, 张佳诗, 路杨, 赵宇, 张延明, 徐文静, 2015. 球孢白僵菌在玉米中的定殖研究. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 31(6): 122–126.]
- Wu KM, 2020. Management strategies of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) in China. *Plant Protection*, 46(2): 1–5. [吴孔明, 2020. 中国草地贪夜蛾的防控策略. 植物保护, 46(2): 1–5.]
- Yang XL, Liu YC, Luo MZ, Li Y, Wang WH, Wan F, Jiang H, 2019. This is the first time the *Spodoptera frugiperda* has been found in Jiangcheng county, Yunnan province. *Yunnan Agriculture*, 2019(1): 72. [杨学礼, 刘永昌, 罗茗钟, 李依, 王文辉, 万飞, 姜虹, 2019. 云南省江城县首次发现迁入我国西南地区的草地贪夜蛾. 云南农业, 2019(1): 72.]
- Zhao W, 2019. Study on isolation, identification, culture and pathogenicity of a *Beauveria bassiana* strain. Master dissertation. Harbin: Northeast Agricultural University. [赵薇, 2019. 一株白僵菌菌株的分离鉴定培养及致病力研究. 硕士学位论文. 哈尔滨: 东北农业大学.]