

研究报告

一种寄生茶小绿叶蝉蜡蚧菌的鉴定及产孢条件优化

周叶鸣 邹晓* 瞿娇娇 周家喜 李娟

(贵州大学生命科学学院 真菌资源研究所 贵州 贵阳 550025)

摘要: 【目的】对寄生茶小绿叶蝉的丝状真菌进行鉴定和分生孢子培养研究。【方法】采用形态特征比较和转录间隔区(ITS)序列构建系统树进行分析,分生孢子培养通过单因素筛选和正交试验进行产孢条件优化。【结果】根据形态特征比较和系统发育分析表明,该真菌为渐狭蜡蚧菌 *Lecanicillium attenuatum* Zare & W. Gams。最优产孢条件(质量体积比)为:蛋白胨 2%,麦芽糖 1%,蚕蛹粉 1%,氯化钾 0.05%,磷酸氢二钾 0.1%,七水硫酸镁 0.05%,琼脂 1.5%,蒸馏水 1 000 mL, 25 °C。【结论】通过形态特征比较和分子序列分析表明,罹病茶小绿叶蝉上的真菌为已知种——渐狭蜡蚧菌,并对该菌株进行了产孢条件的优化。研究结果为该菌株应用到茶小绿叶蝉的生物防治研究提供基础资料。

关键词: 蜡蚧菌, 渐狭蜡蚧菌, 小绿叶蝉, 产孢条件

Identification of a parasitic *Lecanicillium* of tea lesser leafhopper and optimization of sporulation conditions

ZHOU Ye-Ming ZOU Xiao* QU Jiao-Jiao ZHOU Jia-Xi LI Juan

(Institute of Fungal Resource, College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

Abstract: [Objective] The objectives are to identify a parasitic *Lecanicillium* W. Gams & Zare of tea lesser leafhopper and optimize sporulation culture condition of this fungus. [Methods] The comparison of morphological characteristics and internal transcribed spacer (ITS) sequence analysis were used for identification of the fungal species. Single factor test and orthogonal test were carried out to optimize sporulation conditions. [Results] According to the morphological characterization and phylogenetic tree, the fungus was identified as *Lecanicillium attenuatum* Zare & W. Gams. The optimum condition of or sporulation is: peptone 2%, maltose 1%, silkworm pupa powder 1%, potassium chloride 0.05%, dipotassium phosphate 0.1%, magnesium sulfate 0.05%, agar 1.5%, distilled water 1 000 mL, 25 °C. [Conclusion] A parasitic *Lecanicillium* of tea lesser leafhopper is

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31360031, 31093440, 31493010, 31493011); Science and Technology Key Project of Guizhou Province (No. Qiankehe NY[2013]3034); Graduate Student Innovation Fund of Guizhou University (No. Yannong2015015)

*Corresponding author: E-mail: ls.zoux@gzu.edu.cn

Received: September 15, 2015; **Accepted:** January 14, 2016; **Published online** (www.cnki.net): January 21, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31360031, 31093440, 31493010, 31493011); 贵州省科技攻关项目(黔科合 No. NY[2013]3034); 贵州大学研究生创新基金(研农 No. 2015015)

*通讯作者: E-mail: ls.zoux@gzu.edu.cn

收稿日期: 2015-09-15; **接受日期:** 2016-01-14; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-01-21

identified as *L. attenuatum* Zare & W. Gams, a known species in China. The optimum condition of sporulation was provided, which could provide the preliminary basis for applying to the tea lesser leafhopper of the biological control.

Keywords: *Lecanicillium*, *Lecanicillium attenuatum*, Tea lesser leafhopper, Sporulation

有丝分裂真菌中，蜡蚧菌 *Lecanicillium* W. Gams & Zare (又称蜡蚧轮枝菌、蜡蚧霉)是已经被商品化的虫生真菌^[1]。蜡蚧菌最早被 Zimmermann 命名为蜡蚧头孢霉 *Cephalosporium lecanii* Zimm. ; 而后 Viegas 将其并入轮枝孢属 *Verticillium* Nees。形式属轮枝孢属的寄主范围很广，包括节肢动物、线虫、植物和真菌^[2]。Zare 和 Gams^[3]于 2001 年通过形态学和基于 ITS1-5.8S-ITS2 的 rDNA 分析重新对该形式属进行了定位，将该属中所有昆虫病原菌放在了新属蜡蚧菌属 *Lecanicillium* W. Gams & Zare 中^[4]。其中包括 *Lecanicillium attenuatum* Zare & W. Gams、*L. lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams、*L. longisporum* (Petch) Zare & W. Gams、*L. muscarium* (Petch) Zare & W. Gams、*L. nodulosum* (Petch) Zare & W. Gams，而这些种在之前被统一称为蜡蚧轮枝菌 *Verticillium lecanii* Zimm.^[2,4]。对这样的分类系统而言，先前有关蜡蚧轮枝菌的研究可能会包括蜡蚧菌属的一些种，Goettel 等在对相关文献研究之后发现一些学者只是单纯地用 *Lecanicillium* 取代了 *Verticillium*，并没有提供必要的证据信息，从而增加了蜡蚧菌属的混乱程度^[5-6]。

基于蜡蚧菌开发的或正在研发的商品化制剂至少有 15 种，有些制剂的菌种名称不够准确。但是有些制剂是基于早期的蜡蚧轮枝菌而开发，包含了蜡蚧菌属中多个种。对原始菌株的界定不清使得这些商品制剂的成分往往不同，甚至有些商品根本不含有注册的菌株^[2]。

渐狭蜡蚧菌 *Lecanicillium attenuatum* 是蜡蚧菌属 *Lecanicillium* W. Gams & Zare 中的一个重要的种。该菌寄主广泛，已经确证的有从波兰的一种毛虫、美国的一株枯枝^[2]、朝鲜的蚜虫^[7]和黑龙江的大豆胞囊线虫^[8]上成功分离得到，但从茶小绿叶蝉上分离得到渐狭蜡蚧菌尚未见报道。渐狭蜡蚧

菌可以有效寄生线虫的卵^[4]、桃蚜^[9]、棉蚜^[10]等农业害虫，具有重要的生防潜力。茶小绿叶蝉 *Empoasca flavescens* (Fab.)是危害贵州省茶叶的主要害虫之一，郑姗姗等^[11]报道了蜡蚧轮枝菌对茶假眼小绿叶蝉具有一定的防治效果。本文从茶小绿叶蝉上分离得到渐狭蜡蚧菌，这对于防治茶小绿叶蝉具有潜在的应用价值。

1 材料与方法

1.1 培养基

PDA 培养基参照文献^[12]。基础培养基(g/L)：葡萄糖 20.0，硝酸钠 2.0，氯化钾 0.5，磷酸氢二钾 1.0，七水硫酸镁 0.5，七水硫酸亚铁 0.01，琼脂 15.0，蒸馏水 1 000 mL^[13]。

1.2 菌株分离及培养

标本来自贵州省遵义市凤冈县仙人岭茶园，为罹病茶小绿叶蝉。用火焰灭菌后的接种针小心地挑取标本表面的菌丝，接种在无菌、含有抗生素的 PDA 平板上，待目标真菌长出后及时转接至新的 PDA 平板上进行纯化培养。25 °C 培养 14 d 后观察菌落特征并镜检微观形态。选取纯化好的菌落编号保存，本文菌株标号为 Gzuifrlun-1404，现保存于贵州大学真菌资源研究所菌种保藏中心(GZAC)。

1.3 DNA 的提取及 ITS 序列扩增

从 PDA 平板上挑取菌丝体，根据 Tigano-Milani 等的方法提取总 DNA^[14]。提取的 DNA 置于-20 °C 保存，选用通用引物 ITS5 (5'-GGTGAGAGATTCTGTG-3')和 ITS4 (5'-TCC TCCGCTTATTGATATGC-3') 扩增 ITS 区的 nrDNA。反应体系(25 μ L)：ddH₂O 8.5 μ L，模板 (10-100 mg/L) 2 μ L，引物 ITS4 和 ITS5 均为 (0.4 μ mol/L) 1 μ L，Master mix 为 12.5 μ L。PCR 反应条件：94 °C 5 min；94 °C 40 s，49 °C 40 s，

72 °C 60 s , 35 个循环 ; 72 °C 10 min。PCR 产物送上海 Invitrogen 公司纯化测序。

1.4 系统发育分析

测序结果经手工比对校正后提交 GenBank , 登录号为 KT345700。用 NCBI 的 BLAST 程序进行比对 , 下载相似度大于 90% 的核酸序列以及其他相关的部分真菌序列。表 1 为本研究用于系统发育学分析的所有序列。用 MEGA 5.2 对序列进行对齐剪切后构建系统发育树 , 运行条件为邻接法 (Neighbor-Joining) , 运算次数 (Replications) 1 000 次^[15]。用 *Rotiferophthora minutispora* 作为外群^[5]。

1.5 产孢条件筛选

1.5.1 单因子实验: 在基础培养基的基础上 , 分别改变碳源、氮源、生长因子 , 每 1 000 mL 培养基中 , (1) 碳源 : 对照组、蔗糖、海藻糖、麦芽糖、乳糖、甘油、淀粉各 30 g ; (2) 氮源 : 对照组、蛋白胨、酵母浸出汁、尿素、硫酸铵、硝酸

钾各 10 g ; (3) 改变添加物 : 对照组、马铃薯汁 200 mL、土壤浸出液 200 mL、蚕蛹粉浸出液 200 mL^[16]。接种活化过的 *Lecanicillium attenuatum* (菌块大小为 1.5 mm×1.5 mm×0.5 mm) , 用食品袋封住培养皿 , 放入培养箱中 , 培养温度为 25 °C , 每组 3 个对照 , 重复 3 次。连续观察菌落的生长情况 , 培养至第 2 天开始采用十字交叉法测量菌落生长直径 , 每隔 2 d 观测 1 次 , 直至第 12 天。用刀片将培养 12 d 的菌落移入灭菌的带有玻璃珠的 20 mL 吐温水中 , 涡旋振荡 1 min , 用血球计数板计数。

1.5.2 正交试验: 选定最佳碳源、氮源 , 添加物和培养温度作为考察因素 , 每个因素各取 3 个水平 , 采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交试验 , 获得最优配比及培养基条件。

1.6 数据统计与分析

数据采用 DPS 软件和 Excel 软件进行统计和分析。

表 1 系统学分析所用 ITS1-5.8S-ITS2 序列及其 GenBank 登录号			
Table 1 List of ITS1-5.8S-ITS2 sequences and GenBank accession numbers for phylogenetic analysis			
种类 Species	GenBank accession No.	种类 Species	GenBank accession No.
<i>Lecanicillium acerosum</i>	EF641893	<i>L. psalliotae</i>	KF358373
<i>L. aphanocladii</i>	KC574075	<i>L. saksenae</i>	KP260559
<i>L. araneicola</i>	JN255572	<i>L. tenuipes</i>	JQ764778
<i>L. attenuatum</i>	AB378512	<i>Simplicillium aogashimaense</i>	AB604002
<i>L. antillanum</i>	KP334110	<i>S. cylindrosporum</i>	AB604006
<i>L. dimorphum</i>	AJ292429	<i>S. lamellicola</i>	LC035065
<i>L. fungicola</i>	FJ481016	<i>S. lanosoniveum</i>	JN116646
<i>L. fungicola</i> var. <i>fungicola</i>	KC964107	<i>S. minatense</i>	AB603992
<i>L. fusisporum</i>	KF766521	<i>S. obclavatum</i>	KJ173543
<i>L. lecanii</i>	FJ515771	<i>S. subtropicum</i>	AB603995
<i>L. longisporum</i>	KF933099	<i>Simplicillium sympodiophorum</i>	AB604003
<i>L. muscarium</i>	EF513017	<i>Rotiferophthora minutispora</i>	AJ292411
<i>L. primulinum</i>	AB712268	Gzuifrlun-1404	KT345700

2 结果与分析

2.1 渐狭蜡蚧菌 已知种 图 1

Lecanicillium attenuatum Zare & W. Gams Figure 1

寄主昆虫体长约 4 mm, 菌丝布满虫体表面, 菌丝白色。菌落在 PDA 培养基中生长较快, 25 °C、10 d 直径达到 26 mm, 白色, 有褶皱, 背白色微黄。产孢细胞直接自匍匐的菌丝上长出, (10.8–20.7) μm × (0.9–1.8) μm ; 气生孢子形成孢子团 4.5–7.2 μm , 用无菌水或棉兰染色液处理之后孢子逐渐散开成柱状, (2.7–7.2) μm × (0.9–1.8) μm 。

研究标本: Gzuifrlun-1404, 采集人: 周叶鸣, 2014 年 4 月, 罹病小绿叶蝉, 标本采自贵州省遵义市凤冈县仙人岭茶庄。现保存于贵州大学真菌资源研究所。

地理分布: 波兰、美国、朝鲜、中国都有分布。

从菌株 Gzuifrlun-1404 中扩增出来的 ITS 序列与 GenBank 中已有核酸序列 BLAST 结果表明, 菌株 Gzuifrlun-1404 的 rDNA-ITS 序列与 *L. attenuatum* 的相应序列相似性为 100%。通过系统发育树分析显示, 菌株 Gzuifrlun-1404 与 *L. attenuatum* 属同种 (图 2)。

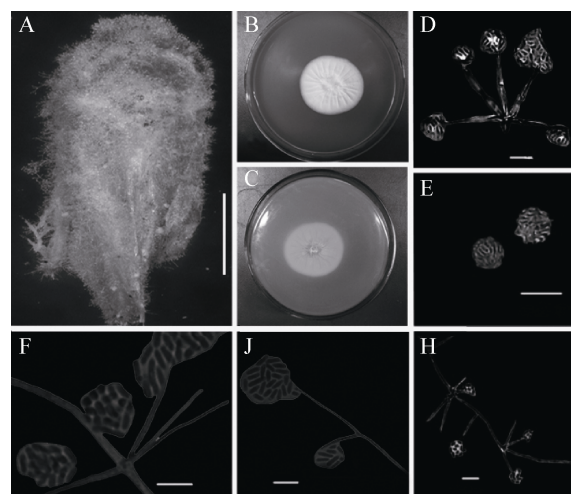


图 1 渐狭蜡蚧菌无性阶段产孢结构和菌落特征 (Gzuifrlun-1404)

Figure 1 Conidiogenous structures and colonies of *Lecanicillium attenuatum* Gzuifrlun-1404

注: A: 标本; B、C: 在 PDA 上培养 14 d 后形成的菌落; D、E: 产孢结构和分生孢子(直接用胶带粘片); F、J: 产孢结构(用棉兰染色液固定); H: 产孢结构(用无菌水固定)。标尺: A: 1 mm; D–H: 10 μm 。

Note: A: The specimen; B, C: Colonies on PDA media for 14 days; D, E: The phialides structure on hyphae and the Conidia (Directly with sticky tape); F, J: The phialides structure on hyphae (In median dye fixation); H: The phialides structure on hyphae (In median dye fixation). A: Bar=1 mm; D–H: Bar=10 μm .

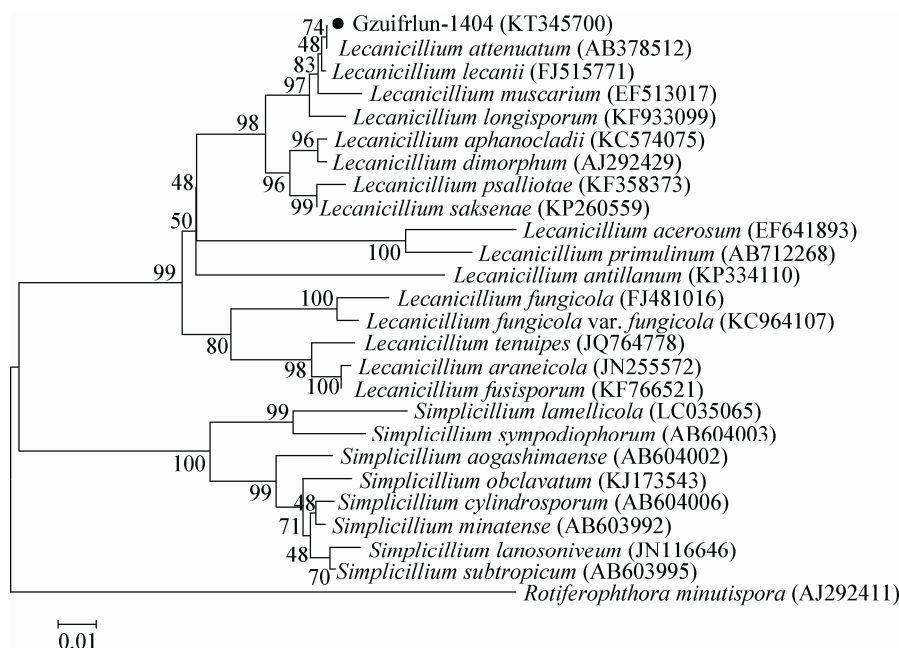


图 2 菌株 Gzuifrlun-1404 及其相关种类基于 ITS1-5.8S-ITS2 的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree based on rDNA ITS1-5.8S-ITS2 sequences of Gzuifrlun-1404 related species

2.2 产孢条件筛选

2.2.1 不同碳源筛选: 由表 2 可知, 不同碳源对 *Lecanicillium attenuatum* 的产孢影响不一样, 经 DPS 单因素方差检验, 碳源以麦芽糖最佳, 其产孢量最大为 10.450×10^6 个/mL, 且麦芽糖与其他碳源的差异显著($P<0.05$)。

2.2.2 不同氮源筛选: 由表 3 可知, 经 DPS 单因素方差检验, 氮源以蛋白胨最佳, 其产孢量最大为 30.167×10^6 个/mL。蛋白胨除与酵母浸出汁没有显著差异外, 与其他氮源的差异显著($P<0.05$)。

表 2 不同碳源对 <i>Lecanicillium attenuatum</i> 产孢量的影响		
Table 2 The effect of different carbon sources on sporulation of <i>Lecanicillium attenuatum</i>		
编号 Number	碳源 Carbon sources	产孢量($\times10^6$ 个/mL) Sporulation ($\times10^6$ spores/mL)
1	Maltose	10.450 \pm 0.638 a
2	Mycose	8.167 \pm 0.586 b
3	Glycerol	7.033 \pm 1.239 bc
4	Glucose	8.150 \pm 0.458 b
5	Starch	5.733 \pm 0.723 cd
6	Lactose	3.817 \pm 0.814 d

注: 表中数据为均值, 同一列数据中标识不同字母的数据表示与其他数据差异显著($P<0.05$), 下同。
Note: The data in the table is the mean and the data in the same column with different letters show significant differences with others ($P<0.05$), the same below.

表 3 不同氮源对 <i>Lecanicillium attenuatum</i> 产孢量的影响		
Table 3 The effect of different nitrogen sources on sporulation of <i>Lecanicillium attenuatum</i>		
编号 Number	氮源 Nitrogen sources	产孢量($\times10^6$ 个/mL) Sporulation ($\times10^6$ spores/mL)
1	Yeast leaching juice	24.817 \pm 5.717 a
2	Urea	2.200 \pm 0.409 b
3	(NH ₄) ₂ SO ₄	7.017 \pm 0.862 b
4	Peptone	30.167 \pm 6.580 a
5	KNO ₃	13.317 \pm 3.126 b

2.2.3 不同添加因子筛选: 由表 4 可知, 经 DPS 单因素方差检验, 添加因子以蚕蛹粉最佳, 其产孢量最大为 38.067×10^6 个/mL, 蚕蛹粉与其他添加因子的差异显著($P<0.05$)。

2.2.4 正交试验: 根据单因素筛选的结果, 选取影响 *Lecanicillium attenuatum* 的产孢量的各因素中有意义的水平进行正交试验, 以确定最佳配比。采用 L₉(3⁴)正交表, 以蛋白胨(A)、麦芽糖(B)、蚕蛹粉(C)、温度(D)作为 4 个考察因素, 选取 3 个水平进行实验。按表 5 的正交因素水平设计 L₉(3⁴)正交试验, 结果见表 6。

以每个培养皿为指标进行直观分析(表 6)和方差分析(表 7), 经过方差分析结果表明 4 个因素都对 *L. attenuatum* 产孢有显著影响。使用 DPS 软件分别对 4 个因素进行各水平比较, 并进行多重比较(LSD 法), 各个处理间的差异性检验结果被列在了表 5 中。综合单因素筛选的结论, 最佳配比为

表 4 不同添加因子对 <i>Lecanicillium attenuatum</i> 产孢量的影响		
Table 4 The effect of different adding factors on sporulation of <i>Lecanicillium attenuatum</i>		
编号 Number	添加因子 Addition factor	产孢量($\times10^6$ 个/mL) Sporulation ($\times10^6$ spores/mL)
1	Silkworm chrysalis powder	38.067 \pm 1.848 a
2	Potato	29.400 \pm 1.750 b
3	Soil	12.950 \pm 1.602 c

表 5 影响 <i>Lecanicillium attenuatum</i> 产孢量 L ₉ (3 ⁴)正交试验因素水平表				
Table 5 Factors and levels for L ₉ (3 ⁴) orthogonal array design on influence spore production quantity of <i>Lecanicillium attenuatum</i>				
水平 Level	A 蛋白胨 A Peptone (%)	B 麦芽糖 B Maltose (%)	C 蚕蛹粉 C Silkworm pupa powder (%)	D 温度 D Temperature (°C)
1	1	1	0.5	15
2	2	2	1.0	20
3	3	3	1.5	25

表 6 正交试验结果
Table 6 Orthogonal test results

编号 Number	A 蛋白胨 A Peptone (%)	B 麦芽糖 B Maltose (%)	C 蚕蛹粉 C Silkworm pupa powder (%)	D 温度 D Temperature (°C)	产孢量($\times 10^6$ 个/mL) Sporulation ($\times 10^6$ spores/mL)			均值 Mean value
					1	2	3	
1	1	1	0.5	15	2.900	2.450	3.100	2.817 g
2	1	2	1	20	10.900	8.550	1.085	6.845 efg
3	1	3	1.5	25	16.700	10.900	13.05	13.550 cd
4	2	1	1	25	35.300	46.900	41.300	41.167 a
5	2	2	1.5	15	4.700	7.100	5.900	5.900 fg
6	2	3	0.5	20	11.700	11.500	11.100	11.433 def
7	3	1	1.5	20	22.600	21.300	23.200	22.367 b
8	3	2	0.5	25	15.500	16.000	19.950	17.150 bc
9	3	3	1	15	9.950	10.650	14.650	11.750 cde
\bar{x}_1	7.737	22.117	10.467	6.822				
\bar{x}_2	19.500	9.965	19.921	13.548				
\bar{x}_3	17.089	12.244	13.939	23.956				
R	11.763	12.152	9.454	17.133				

表 7 方差分析
Table 7 Analysis of variance

方差来源 Source of variation	离均差平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方误差 Mean square error	F 值 F	显著性 Significance
A	694.890	2	347.445	33.594	**
B	750.959	2	375.480	36.304	**
C	411.638	2	205.819	19.900	**
D	1 341.306	2	670.653	64.843	**
误差 Error	165.483	16	10.343		

A₂B₁C₂D₃, 即最适配比和培养条件为(质量体积比): 蛋白胨 2%, 麦芽糖 1%, 蚕蛹粉 1%, 氯化钾 0.05%, 磷酸氢二钾 0.1%, 七水硫酸镁 0.05%, 琼脂 1.5%, 蒸馏水 1 000 mL, 25 °C。

3 讨论

蜡蚧菌属真菌除了被开发成生物杀虫剂用来防治昆虫危害之外, 还常表现出对植物病原线虫和植物病原真菌的控制效果^[10]。因此, 这类真菌的开发利用将为防治农业病虫害提供了广阔的应用前景。渐狭蜡蚧菌虽已被应用到农业的害虫防治上, 但未见对茶小绿叶蝉的防治有相关的报道。

寄主昆虫的种类在昆虫病原真菌种的界定上

是重要的鉴别特征之一^[17]。在寄主范围较广的一类真菌中, 同一种真菌的不同菌株对寄主的偏好性也常表现出差异。本文从茶小绿叶蝉尸体上成功分离得到蜡蚧菌菌株 Gzuifrlun-1404, 明确了该菌株的分类地位。对该菌株的产孢条件优化也为该菌株的应用提供了重要的基础。菌株 Gzuifrlun-1404 为小绿叶蝉的潜在生防菌株, 该菌株的获得也丰富了小绿叶蝉的真菌寄主。

肉座菌科/麦角菌科共同祖先早先寄生于植物及其残体。随后的进化使得其能够寄生于特异的动物和真菌^[18]。渐狭蜡蚧菌曾被报道从枯枝^[2]和土壤^[13]中分离得到, 也被报道从线虫^[8]和刺吸式口器的昆虫^[7]中分离得到。从菌株 Gzuifrlun-1404 生长

因子的筛选结果来看, 该菌株的营养源偏好动物。线虫生活于土壤-植物从土壤中吸收营养-昆虫取食植物, 真菌寄主是否存在这样的一个跃迁模型? 这是一个有趣的生物学问题。

参 考 文 献

- [1] Marcos R, de Faria D, Wraight SP. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types[J]. Biological Control, 2007, 43(3): 237-256
- [2] 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
- [3] Gams W, Zare R. A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. III. genetic classification[J]. Nova Hedwigia, 2001, 72: 329-337
- [4] Zare R, Gams W, Culham A. A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. I. phylogenetic studies using ITS sequences[J]. Nova Hedwigia, 2000, 71: 465-480
- [5] Goettel MS, Koike M, Kim JJ, et al. Potential of *Lecanicillium* spp. for management of insects, nematodes and plant diseases[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2008, 98(3): 256-261
- [6] Sugimoto M, Koike M, Hiyama N, et al. Genetic, morphological, and virulence characterization of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2003, 82(3): 176-187
- [7] Kim JJ, Goettel MS, Gillespie DR. Potential of *Lecanicillium* species for dual microbial control of aphids and the cucumber powdery mildew fungus, *Sphaerotheca fuliginea*[J]. Biological Control, 2007, 40(3): 327-332
- [8] Zhao Y, Chen DX, Wang FL, et al. Identification of fungus *Lecanicillium attenuatum* and cloning of its chitinase gene *LACHII*[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2014, 29(4): 63-70 (in Chinese)
赵洋, 陈德鑫, 王凤龙, 等. 渐狭蜡蚧菌的鉴定及其几丁质酶基因 *LACHII* 的克隆[J]. 华北农学报, 2014, 29(4): 63-70
- [9] Kim HY, Lee HB, Kim YC, et al. Laboratory and field evaluations of entomopathogenic *Lecanicillium attenuatum* CNU-23 for control of green peach aphid (*Myzus persicae*)[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 18(12): 1915-1918
- [10] Kim JJ, Kim KC. Selection of a highly virulent isolate of *Lecanicillium attenuatum* against cotton aphid[J]. Journal of Asia-Pacific Entomology, 2008, 11(1): 1-4
- [11] Zheng SS, Jiang RL, Tian L, et al. Effectiveness of *Schizophragma parvulus* and *Lecanicillium lecanii* in controlling tea leafhopper *Empoasca vitis* population[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2012, 34(2): 282-287
郑珊珊, 姜荣良, 田麟, 等. 蜡蚧轮枝菌和缨小蜂对假眼小绿叶蝉的协同控制作用[J]. 江西农业大学学报, 2012, 34(2): 282-287
- [12] Shen P, Chen XD. Microbiology Experiment[M]. Beijing: Higher Education Press, 2007: 241-243 (in Chinese)
沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007: 241-243
- [13] Zhang ZR, Zhang YJ, Xie M. Identification and biological characteristics of a *Lecanicillium* isolate originating from tropic region and its pathogenicity against *Bemisia tabaci*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2015, 31(1): 64-70 (in Chinese)
张召荣, 张艳军, 谢明. 一株来自热带地区蜡蚧菌的鉴定、生物学特性及其对烟粉虱的致病力[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(1): 64-70
- [14] Tigano-Milani MS, Samson RA, Martins I, et al. DNA markers for differentiating isolates of *Paecilomyces lilacinus*[J]. Microbiology, 1995, 141(Pt1): 239-245
- [15] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5(2): 150-163
- [16] Qi YX, Chen FX, Li ZZ. Effects of carbon sources and nitrogen sources on the biological characteristics and antifungal activity of *Beauveria bassiana*[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2011, 20(1): 38-44 (in Chinese)
齐永鑫, 陈方新, 李增智. 不同碳、氮营养对球孢白僵菌生物学特性和抑菌活性的影响[J]. 激光生物学报, 2011, 20(1): 38-44
- [17] Nikoh N, Fukatsu T. Interkingdom host jumping underground: phylogenetic analysis of entomoparasitic fungi of the genus *Cordyceps*[J]. Molecular Biology and Evolution, 2000, 17(4): 629-638
- [18] Spatafora JW, Sung GH, Sung JM, et al. Phylogenetic evidence for an animal pathogen origin of ergot and the grass endophytes[J]. Molecular Ecology, 2007, 16(8): 1701-1711