

## 研究报告



## 莱氏野村菌紫外线诱变抗敌敌畏菌株的生理特性

王诗玮 纪琪 朱天辉\*

四川农业大学林学院 四川 成都 611130

**摘要:**【背景】夜蛾科害虫易对化学杀虫剂产生高抗性,但一些化学农药可以对部分虫生真菌的毒力作用效果起增幅作用,目前缺乏对莱氏野村菌(*Nomuraea rileyi*)的该方面研究。【目的】探究对常用有机磷杀虫剂敌敌畏具有较强耐药性的紫外线诱变莱氏野村菌突变菌株的生理特性,包括菌丝生长、产孢情况和几丁质酶活性。【方法】在紫外线诱变莱氏野村菌结合药剂驯化筛选出的突变株 Nr-UVY1 和 Nr-UVY6 基础上,以添加不同含量敌敌畏的平板培养基对突变株进行菌丝生长抑制率、继代产孢量、几丁质酶活性测定。【结果】在含 1 291 mg/L 敌敌畏的培养基上,敌敌畏对出发菌株菌丝生长抑制率达到 100%,突变株 Nr-UVY1 (42.38%)和 Nr-UVY6 (37.01%)均远低于出发菌株。处理浓度大于 1 291 mg/L 时,2 株突变株的菌丝生长抑制率曲线平稳上升且远低于出发菌株,说明突变株对敌敌畏的抗药性显著且稳定。在各浓度敌敌畏含量的培养基上,突变株 Nr-UVY6 得到的菌丝抑制率均小于 Nr-UVY1,说明突变株 Nr-UVY6 对敌敌畏的抗药性更强。在同样的培养条件下,2 株突变株的开始产孢时间略迟于出发菌株。突变株各代的产孢量均明显高于出发菌株,尤其是突变株 Nr-UVY6 各代的产孢量始终高于出发菌株 2 倍以上且更稳定。透明圈法测定几丁质酶活性,突变株 Nr-UVY6 高于 Nr-UVY1 和出发菌株。【结论】筛选出的经过紫外线诱变的突变菌株对敌敌畏的抗性远高于出发菌株,在生长和繁殖方面表现出更优秀的性状,并且由于其几丁质酶的活性高,可进一步探究其致病性。

**关键词:** 紫外线诱变, 莱氏野村菌, 菌丝生长抑制率, 继代产孢量, 胞外酶

Physiological characteristics of the anti-dichlorvos *Nomuraea rileyi* strains by UV mutagenized

WANG Shiwei JI Qi ZHU Tianhui\*

College of Forestry, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China

**Abstract:** [Background] Injurious insect (Noctuidae) tend to develop high resistance to chemical pesticides, some of them can increase the effect of some entomogenous fungi. There is a lack of research on *Nomuraea rileyi* in this part currently. [Objective] To explore the physiological characteristics of UV-mutant *Nomuraea rileyi* mutants, which are highly resistant to dichlorvos, a common organophosphate insecticide, including mycelial growth, sporulation and the activity of chitin enzyme. [Methods] Based on the mutant strains Nr-UVY1 and Nr-UVY6, which were screened by UV-induced mutagenesis of *Nomuraea rileyi*, the mycelial growth inhibition rate, the subculture sporulation amount, and the chitinase

**Foundation item:** China Postdoctoral Science Foundation (2016M602705)

\*Corresponding author: Tel: 86-28-86291456; E-mail: zhuth1227@126.com

Received: 06-03-2020; Accepted: 21-07-2020; Published online: 09-09-2020

基金项目: 中国博士后基金面上项目(2016M602705)

\*通信作者: Tel: 028-86291456; E-mail: zhuth1227@126.com

收稿日期: 2020-03-06; 接受日期: 2020-07-21; 网络首发日期: 2020-09-09

activity were measured by the addition of different concentrations of dichlorvos growth medium. **[Results]** On the medium containing 1 291 mg/L dichlorvos, the inhibition rate of dichlorvos on the mycelial growth of the original strain reached 100%, and the mutant Nr-UVY1 (42.38%) and Nr-UVY6 (37.01%) were far away lower than the original strain. According to the mycelial growth inhibition rate curve, when the treatment concentration was higher than 1 291 mg/L, the curves of the two mutant strains increased steadily and were much lower than the original strain, indicating that the resistance of the mutant strains to dichlorvos was remarkable and stable. On the medium with different concentrations of dichlorvos, the mycelial inhibition rate of the mutant strain Nr-UVY6 was smaller than that of the mutant strain Nr-UVY1, manifesting Nr-UVY6 was more resistant to dichlorvos. On the same culture conditions, the initial sporulation time of the two mutant strains was slightly later than the original strain, but the difference was not significant. The sporulation of the mutants was significantly higher than that of the original strains in each generation. In particular, the sporulation of Nr-UVY6 was always more than 2 times higher than the original strain and more stable. The chitinase activity measured by the transparent circle method, the mutant strain Nr-UVY6 was higher than Nr-UVY1 and the starting strain. **[Conclusion]** The mutant strains subjected to ultraviolet mutagenesis have much higher resistance to dichlorvos than the original strains, and exhibit better traits in growth and reproduction, and it is possible to further explore their level of pathogenicity due to their high activity of chitinase enzyme.

**Keywords:** UV mutagenesis, *Nomuraea rileyi*, mycelial growth inhibition rate, sporulation quantity, extracellular enzyme

莱氏野村菌(*Nomuraea rileyi*)是一种重要的昆虫病原真菌,通常又称为莱氏蛾霉或绿色穗霉,现也有称莱氏绿僵菌,对夜蛾科害虫具有较强的致病性。通常使用的方法是以孢子悬浮液的形式喷施到农作物或者林木上或以土壤缓释的方式来感染靶标害虫。其通过穿透昆虫的表皮侵染到体内,该过程依赖于酶的压力和机械压力的共同作用,可分为附着、孢子萌发、穿透体壁并侵入、体内定殖4个步骤。周立峰等发现,该菌对斜纹夜蛾的田间侵染率超过90%,有着巨大的应用潜力<sup>[1]</sup>。虫生真菌得到广泛应用的最大优势在于其可以侵染不同种类的昆虫及昆虫的不同发育阶段,包括蛹期<sup>[2-3]</sup>,并且在适宜的条件下引发昆虫种群中病害流行,从而有效地控制虫害,是一种高效、环保的实用生防菌。

虫害的经常性暴发与化学杀虫剂的频繁使用有关,使得害虫的抗药性日益增强,国外对夜蛾科害虫的抗药性早有相关研究<sup>[4]</sup>。夜蛾科害虫因其广食性、多化性以及体内具有高活性的解毒酶,从而容易对化学杀虫剂产生高抗性<sup>[5]</sup>。化学农药可以对部分虫生真菌的毒力作用起增幅<sup>[6]</sup>,却对其他

虫生真菌起抑制作用<sup>[7-8]</sup>。在常用的杀虫剂中,敌敌畏、甲基对硫磷、硫丹、敌百虫、苯菌灵等对莱氏野村菌菌丝的生长或孢子形成具有一定的抑制作用<sup>[9]</sup>。邱思鑫等测定了20种常用杀虫剂对莱氏野村菌孢子萌发和菌丝生长造成的影响,结果表明,20种常用杀虫剂中,60%的杀虫剂对孢子萌发抑制率达50%以上,其中敌敌畏的抑制率高达88.68%<sup>[10]</sup>。

筛选出对真菌遗传稳定性不产生影响的化学杀虫剂,与真菌混配或混用,就可同时结合化学杀虫剂的速效性优势与真菌的持效性稳定性优势,在防控害虫的同时最大程度地减少对环境带来的影响<sup>[11]</sup>。菌株的孢子能附着在寄主昆虫表皮表示菌株具备一定的致病性<sup>[9]</sup>。另有许多研究表明<sup>[9-11]</sup>,化学杀虫剂对莱氏野村菌的菌丝生长有不同程度的影响。Gupta等<sup>[12]</sup>的实验结果表明虫生真菌侵入昆虫过程中产生的酶类与其致病性之间存在较强的相关性,相关酶活性越高,寄主死亡率愈大。因而,几丁质酶活性的高低也能在一定程度上反映突变株致病力的大小,因此,本文开展了莱氏野村菌突变株Nr-UVY1、Nr-UVY6<sup>[13]</sup>在不

同浓度敌敌畏胁迫下的菌丝生长抑制率、产孢能力及几丁质酶的活性测定, 以初步评价突变株的抗药性水平。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

经由紫外线诱变结合敌敌畏药剂驯化后筛选出的抗药性突变株 Nr-UVY1、Nr-UVY6<sup>[13]</sup>, 及没有经过紫外线诱变加药剂驯化的出发菌株, 2 诱变菌通过紫外线诱变获得, 均由四川农业大学森林保护学科实验室提供。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

蛋白胨, 杭州微生物试剂有限公司; 无水葡萄糖、甘油, 西陇科学股份有限公司; 琼脂, 上海伊卡生物技术有限公司; 吐温-80, 成都市科龙化工试剂厂; 敌敌畏, 漯河科瑞达生物科技有限公司; 无水乙醇, 成都市科隆化学品有限公司; 酵母浸粉, 北京奥博星生物技术有限责任公司。

血球计数板, 上海市求精生化试剂仪器有限公司; 智能人工气候箱, 韶关市广智科技设备有限公司。

#### 1.1.3 培养基

PDA 培养基<sup>[14]</sup>(g/L): 土豆 200.00, 葡萄糖 20.00, 琼脂 15.00–20.00, 自然 pH。

PPDA 培养基<sup>[15]</sup>(g/L): 在 PDA 培养基的基础上添加 1% 的蛋白胨即为 PPDA 培养基。

SMAY 培养基<sup>[15]</sup>(g/L): 麦芽糖 40.00, 蛋白胨 10.00, 酵母粉 5.00, 琼脂 20.00, 自然 pH。

胶体几丁质培养基<sup>[16]</sup>(g/L): 胶状几丁质 15.00, 酵母粉 5.00, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.00, MgSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.30, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.36, 琼脂 15.00, 自然 pH。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菌株扩繁

将抗药性突变株 Nr-UVY1、Nr-UVY6 莱氏野村菌菌株转接到 PPDA 斜面培养基上进行扩繁, 在

温度 27 °C、相对湿度在 95%、光照条件 12L:12D 的恒温光照培养箱中培养。

#### 1.2.2 敌敌畏对突变株菌丝生长的影响

经紫外线诱变和含药培养基驯化后获得的高抗性突变株制成 10<sup>2</sup>–10<sup>3</sup> 孢子/mL 的孢子悬浮液, 分别取 0.1 mL 接种于含敌敌畏浓度为 1 291 mg/L 的含药培养基和空白培养基上, 27 °C 恒温培养, 连续转接 7 代, 每隔 8 d 转接一次。

参考崔永三等的方法<sup>[17]</sup>分别配制 7 个浓度的含敌敌畏平板, 因在筛选得到 Nr-UVY1 和 Nr-UVY6 菌株的过程中, 根据敌敌畏的生产推荐用量 968 mg/L (即 800 倍稀释液), 结合紫外线诱变及药剂驯化过程, 已知 2 突变株对敌敌畏的最高耐药浓度为 3 875 mg/L (200 倍稀释液)<sup>[13]</sup>, 因而将浓度梯度设置为 1 600 倍稀释液(0.5 倍生产推荐用量, 484 mg/L)、1 200 倍稀释液(646 mg/L)、800 倍稀释液(968 mg/L)、600 倍稀释液(1 291 mg/L)、400 倍稀释液(1 937 mg/L)、300 倍稀释液(2 583 mg/L)和 200 倍稀释液(3 875 mg/L)。将已培养 10 d 的突变株 Nr-UVY1、Nr-UVY6 和莱氏野村菌出发菌株, 分别打取 5 mm 的菌块接于不同浓度的含药平板和不加敌敌畏的空白平板中央, 在 27 °C 下培养 7 d 后, 以十字交叉法测量菌落直径, 每组处理重复 3 次, 计算不同浓度敌敌畏对各突变株以及出发菌株的生长抑制率。

#### 1.2.3 突变株的产孢情况

选择在固体培养基上对突变株继代培养 7 代后各代的产孢情况进行测定。测定方法如下: 将突变株 Nr-UVY1、Nr-UVY6 和出发菌株在温度 27 °C、相对湿度在 95%、光照条件 12L:12D 的恒温光照培养箱中培养至完全产孢, 制成较纯的孢子悬浮液, 然后用血球计数板测各菌株的产孢量。

#### 1.2.4 突变株几丁质酶活性测定

参照郑秀丽等<sup>[18]</sup>的透明圈法对突变株的几丁质酶活性进行测定: 将突变株 Nr-UVY1、Nr-UVY6 及莱氏野村菌出发菌株接种到胶体几丁

质培养基中，在 27 °C 下培养 5 d 后分别测定透明圈的直径  $R_2$  及菌落直径  $R_1$ ，计算  $R_2/R_1$  的比值，每组处理 3 个重复，比较 3 株菌株的比值差异。

2 结果与分析

2.1 敌敌畏对突变株菌丝生长的影响

突变株 Nr-UVY1、Nr-UVY6 和没有经过紫外线诱变加药剂驯化的出发菌株，在 7 种含有不同浓度敌敌畏的 PDA 培养基以及不含敌敌畏的空白培养基上生长 7–10 d 后，经测量计算得到的平均菌落直径及抑制率如表 1 所示。3 株菌株的菌落平均直径均随着敌敌畏浓度的增加而逐渐减小，而菌丝生长抑制率随着处理浓度的增加而逐渐增加，说明不同浓度的敌敌畏对 3 株菌株的菌丝生长均存在不同程度的抑制作用，浓度越高，抑制作用越显著。在处理浓度为 646 mg/L 时，敌敌畏对出发菌株的抑制率为 13.79%，其抑制率低于同等处理浓度下的 2 株突变株，说明在含少量敌敌畏的培养基中，莱氏野村菌出发菌株与经过紫外线诱变加药剂驯化后的突变株 Nr-UVY1、Nr-UVY6 一样，均对敌敌畏具有一定的耐受性；但当处理浓度大于 646 mg/L 时，

2 株突变株的抑制率明显小于出发菌株，说明在含较高浓度敌敌畏的培养基中，敌敌畏对出发菌株的菌丝生长具有明显的抑制作用，而对 2 株突变株菌丝生长的抑制作用则大幅降低，2 株突变株对敌敌畏的抗性优势得以体现；在处理浓度大于 1 291 mg/L 的培养基上，敌敌畏对出发菌株菌丝生长的抑制率已达到 100%，但 2 株突变株仍然可以正常长出菌丝，说明经过紫外线诱变加药剂驯化后得到的 2 株突变株对敌敌畏的抗药性显著，并且突变株 Nr-UVY6 在各浓度下的抑制率均小于突变株 Nr-UVY1，说明突变株 Nr-UVY6 对敌敌畏的抗药性更强。

如图 1 所示，从外观看 2 株突变株与出发菌株在 PDA 培养基上的菌落形态不同，出发菌株产生的菌落更为分散，而 2 株突变株产生的菌落则更为集中，菌丝更致密。但 3 株菌株的培养特性相似，均无霉味和渗出液，菌落初期均为白色茸状，后期菌落会因产孢逐渐变为橄榄绿色。随着时间的增加，白色菌丝会逐渐被绿色分生孢子覆盖，随后孢子又会被新产生的白色菌丝所覆盖，如此循环往复。

表 1 敌敌畏对突变株菌丝生长的影响

Table 1 Effect of dichlorvos on mycelial growth of mutant strains

处理浓度 Treatment concentration (mg/L)	Nr-UVY1		Nr-UVY6		CK	
	处理直径 Diameter (mm)	抑制率 Inhibition rate (%)	处理直径 Diameter (mm)	抑制率 Inhibition rate (%)	处理直径 Diameter (mm)	抑制率 Inhibition rate (%)
0	10.50±0.34	0.00a	14.05±0.18	0.00a	14.50±0.12	0.00a
484	9.05±0.18	13.81b	12.85±0.20	8.54b	13.05±0.18	10.00b
646	6.90±0.18	34.29c	9.50±0.47	32.38c	12.50±0.15	13.79c
968	6.25±0.17	40.48c	9.00±0.12	35.94c	7.50±0.10	48.28c
1 291	6.05±0.14	42.38c	8.85±0.19	37.01c	3.25±0.09	77.59c
1 937	5.85±0.49	44.29c	8.15±0.19	41.99c	0.00	100de
2 583	5.40±0.19	48.57c	7.60±0.12	45.91c	0.00	100de
3 875	3.40±0.34	67.62d	5.30±0.19	62.28d	0.00	100de

注：菌落直径为 3 组重复处理平均值，同列数据后不同字母表示差异显著性(0.05 水平) ( $P<0.05$ ,  $n=3$ )

Note: The colony diameter is the average of three groups of repeated treatments, and the different letters in the same column indicate the significant difference at the 0.05 level ( $P<0.05$ ,  $n=3$ )

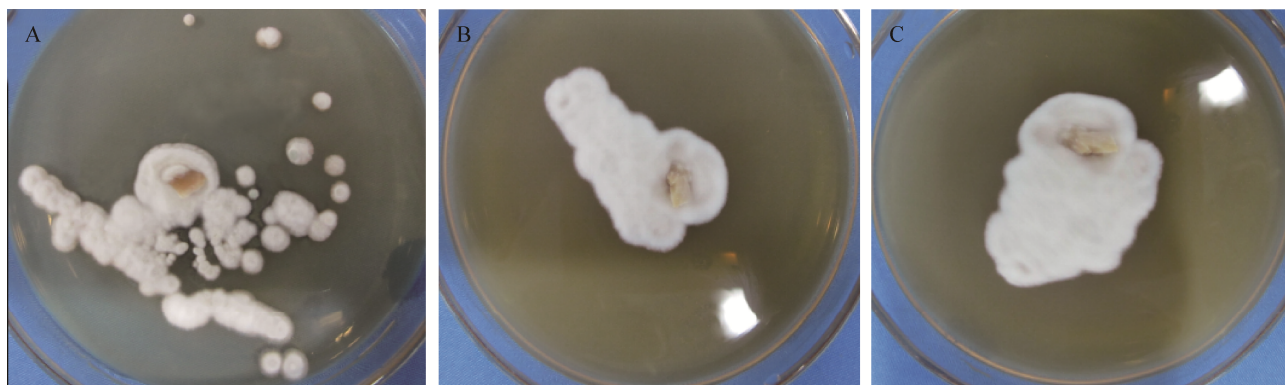


图1 突变株在不含敌敌畏的培养基上的菌丝生长情况

Figure 1 Growth of mycelia of two mutant strains on medium without dichlorvos

注: A: 出发菌株; B: 突变株 Nr-UVY1; C: 突变株 Nr-UVY6

Note: A: The original strains; B: The mutant strain Nr-UVY1; C: The mutant strain Nr-UVY6

从图2可以看出, 2株突变株和出发菌株的菌丝对敌敌畏的敏感性不同, 出发菌株对敌敌畏抗性最弱, 而突变株 Nr-UVY6 对敌敌畏的抗性最强, Nr-UVY1 次之。从总体上看, 2株突变株的抑制率曲线更平滑, 而出发菌株的抑制率曲线更陡、上升幅度更大, 说明与出发菌株相比, 2株突变株对敌敌畏具有更高、更稳定的耐药性。在处理浓度为 0–646 mg/L 的前一小段区间内, 2株

突变株的抑制率要高于出发菌株; 但从 646 mg/L 开始, 出发菌株的抑制率开始迅速上升, 特别是当处理浓度大于 1 219 mg/L 时, 出发菌株的抑制率依然保持高速上升并逐渐趋于 100%; 然而相同浓度处理下的 2株突变株抑制率依然保持平稳上升, 并且抑制率远低于出发菌株, 这说明经过紫外线诱变加药剂驯化后得到的 2株突变株, 对敌敌畏具有显著且稳定的耐药性, 但 2株突变株发挥抗药性优势较慢, 因此可以将突变株的持效性与杀虫剂的速效性相结合联合进行害虫防治。

## 2.2 突变株的产孢能力

经观察, 同样在温度 27 °C、相对湿度为 95%、光照条件 12L:12D 的恒温光照培养箱中培养, 出发菌株第 3 天时肉眼便可见有绿色分生孢子产生, 而经过紫外线照射加药剂驯化后得到的突变株 Nr-UVY1、Nr-UVY6 第 4 天时才有绿色分生孢子产生。因此, 从开始产孢的时间来看, 2株突变株的产孢速度略低于出发菌株, 但差异不大。

从图3可以看出, 随着继代培养代数的增加, 3株菌株的产孢量均有所下降, 说明随着时间的增加和转接次数的增加, 菌株的产孢能力在下降。2株突变株各代的产孢量均明显高于出发菌株, 尤其是突变株 Nr-UVY6 各代的产孢量始终高出突

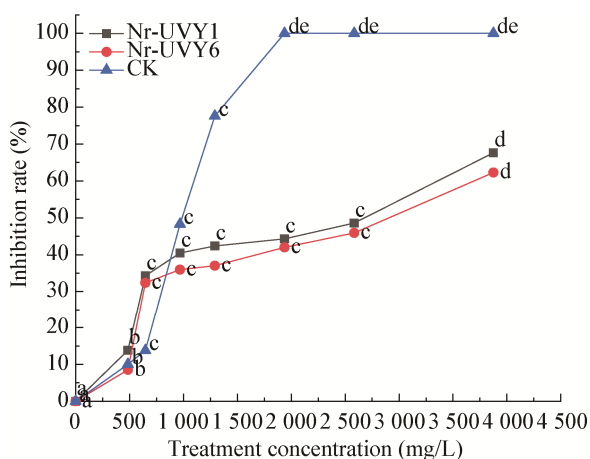


图2 不同敌敌畏处理浓度下3株菌株的抑制率

Figure 2 Inhibitory rates of three strains at different concentrations of dichlorvos

注: 图上的不同字母表示差异显著性(0.05 水平) ( $P < 0.05$ ,  $n=3$ )

Note: The different letters indicate the significant difference at the 0.05 level ( $P < 0.05$ ,  $n=3$ )

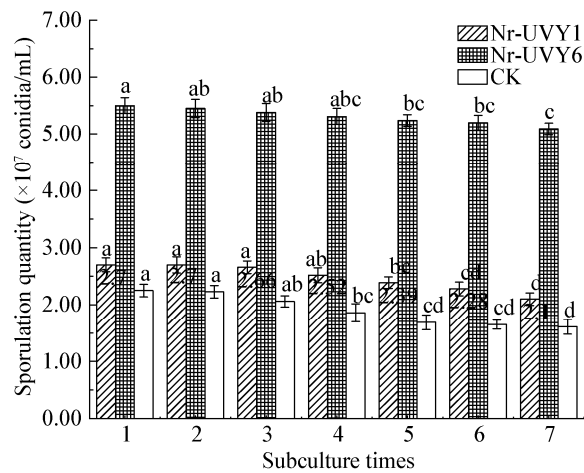


图3 Nr-UVY1 和 Nr-UVY6 继代培养后产孢量测定

Figure 3 Determination of sporulation after subculture of Nr-UVY1 and Nr-UVY6

注：图上的不同字母表示差异显著性(0.05 水平) ( $P<0.05$ ,  $n=3$ )

Note: The different letters indicate the significant difference at the 0.05 level ( $P<0.05$ ,  $n=3$ )

变株 Nr-UVY1 和出发菌株 2 倍以上,说明经过紫外线诱变加药剂驯化后的 2 株突变株的产孢能力有所提高,尤其是突变株 Nr-UVY6,其产孢量最大,产孢能力大幅提高。从图 3 中各菌株产孢量下降的趋势可以看出,出发菌株第 3 代时其产孢量开始出现了显著下降,到第 7 代时其产孢量仅为  $1.61\times 10^7$  个/mL,下降幅度很大;2 株突变株的产孢量下降趋势更平缓,突变株 Nr-UVY1 在前 3 代的产孢量都几乎没有变化,到第 4 代开始出现了明显下降,到第 7 代时,其产孢量为  $2.1\times 10^7$  个/mL;而突变株 Nr-UVY6 在前 5 代的产孢量下降趋势都很慢,到第 7 代时才开始出现显著降低,总体下降幅度很小。因此,就 3 株菌株各代产孢量的稳定性来看,经过紫外线诱变加药剂驯化后的 2 株突变株的稳定性更高,而突变株 Nr-UVY6 又比 Nr-UVY1 表现出了更高的稳定性。所以,综合产孢量及其稳定性来看,突变株 Nr-UVY6 最佳,突变株 Nr-UVY1 次之,出发菌株最差。

2.3 突变株的几丁质酶活性

通过表 2 可以看出,透明圈的直径  $R_2$  与菌落直径  $R_1$  的比值最高的是突变株 Nr-UVY6,突变株

表 2 突变株的几丁质酶活性测定

Table 2 Chitinase activity of mutant strains

Item	Nr-UVY1	Nr-UVY6	CK
$R_1$ (mm)	$3.0\pm0.09$	$3.0\pm0.10$	$3.0\pm0.04$
$R_2$ (mm)	$3.3\pm0.03$	$4.5\pm0.06$	$3.3\pm0.15$
$R_2/R_1$	1.1	1.5	1.1
显著性差异	a	b	a
Significant difference			

注：菌落直径为 3 组重复处理平均值,同列数据后不同字母表示差异显著性(0.05 水平) ( $P<0.05$ ,  $n=3$ )

Note: The colony diameter is the average of three groups of repeated treatments, and the different letters in the same column indicate the significant difference at the 0.05 level ( $P<0.05$ ,  $n=3$ )

Nr-UVY1 的  $R_2/R_1$  比值与出发菌株一样。说明突变株 Nr-UVY6 经过紫外线诱变加药剂驯化后的几丁质酶活力相比出发菌株略有提高。

3 讨论与结论

本研究显示,不同浓度的敌敌畏对 2 株突变株和出发菌株的菌丝生长均存在不同程度的抑制作用,浓度越高抑制作用越显著;与出发菌株相比,经过紫外线诱变加药剂驯化后得到的 2 株突变株,其菌丝对敌敌畏具有显著且稳定的耐药性,而且突变株 Nr-UVY6 对敌敌畏的抗药性更强,但 2 株突变株发挥抗药性优势较慢,因此可以将突变株的持效性优势与杀虫剂的速效性优势相结合联合进行害虫防治。

在通常情况下,真菌的分生孢子活力越大,其作为微生物杀虫剂的致病能力就越高。实验室内测定真菌的分生孢子活力通常采用营养液萌发法<sup>[19-20]</sup>,但是莱氏野村菌属在液体环境中不易产生分生孢子,只能产生芽生孢子,而芽生孢子的侵染力极低<sup>[21]</sup>,在实验室内即使测出孢子萌发率的大小,其与菌株对杜仲梦尼夜蛾致病性的关联也不大,所以本实验在固体培养基上对突变株继代培养 7 代后各代的产孢情况进行测定。产孢情况实验结果表明,随着时间和转接次数的增加,2 株突变株和出发菌株的产孢能力均有所下降;与出发菌株相比,经过紫外线诱变加药剂驯化后的 2 株

突变株的产孢能力均有所提高, 尤其是突变株 Nr-UVY6; 就 3 株菌株各代产孢量的稳定性来看, 2 株突变株的稳定性更高, 而突变株 Nr-UVY6 又比 Nr-UVY1 表现出了更高的稳定性。所以, 综合菌丝生长情况、产孢情况和稳定性来看, 突变株 Nr-UVY6 最佳, 突变株 Nr-UVY1 次之, 出发菌株最差。现有研究表明, 寄主昆虫的表皮成分直接影响莱氏野村菌分生孢子的萌发, 分生孢子必须在寄主昆虫表皮的相关活性物质的刺激下才能萌发。El-Sayed 等<sup>[22]</sup>通过研究发现了部分昆虫表皮的提取物能加快分生孢子萌发。Kumar 等<sup>[23]</sup>通过实验证明黏附在寄主昆虫表皮的莱氏野村菌分生孢子的萌发时间显著减少, 说明昆虫表皮的某些相关活性物质促进了莱氏野村菌分生孢子的萌发。Noda 等<sup>[24]</sup>则从家蚕中分离出了能促进莱氏野村菌分生孢子萌发的相关活性物质。因为孢子萌发后才会穿透昆虫体壁并侵入体腔内, 由此可见, 仅有产孢量的提高是不够的, 还需要对紫外线诱变抗敌敌畏菌株孢子萌发率做进一步探究。

昆虫病原真菌感染寄主昆虫, 在其体内定殖而后致死死亡的过程与一系列复杂的生理生化过程密不可分, 该过程与几丁质酶、蛋白酶、酯酶等一系列酶的作用均有关。有学者研究表明, 几丁质酶、蛋白酶活性的高低和虫生真菌的毒力相关, 并且酶活性越高, 其致病性就越高<sup>[25-28]</sup>。但也有相反的结论显示几丁质酶、蛋白酶活性的高低和虫生真菌的毒力之间不存在显著的相关性, 甚至有些几丁质酶活性低的菌株其致病性表现越高<sup>[29-31]</sup>。本实验通过透明圈法对突变株 Nr-UVY1、突变株 Nr-UVY6 和出发菌株进行几丁质酶活性测定, 结果显示, 突变株 Nr-UVY6 的几丁质酶活力略有提高, 突变株 Nr-UVY1 的几丁质酶活力与出发菌株一样, 但三者之间的差异不显著, 这与许天委<sup>[32]</sup>对金龟子绿僵菌、岳素红<sup>[33]</sup>对白僵菌的诱变结果相似, 这可能与虫生真菌的遗传特性或者诱变方法的作用位点有关。因此, 可以加强诱变机理方面的研究, 在分子层面来阐明莱氏野村菌产生抗药性的分子机理, 可

以通过相关抗性基因的克隆, 提高生防菌对农药的耐受性, 从而大力发展生物防治, 减少化学农药的使用。

## REFERENCES

- [1] Zhou LF, Yu SJ, Liu YB, Wang B. Laboratory assessment on virulence of *Nomuraea rileyi* against noctuid larvae[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2012, 28(1): 47-52 (in Chinese)  
周立峰, 于士军, 刘元兵, 王滨. 莱氏野村菌对夜蛾科害虫防治潜力的室内评测[J]. 中国生物防治学报, 2012, 28(1): 47-52
- [2] Anand R, Prasad B, Tiwary BN. Relative susceptibility of *Spodoptera litura* pupae to selected entomopathogenic fungi[J]. BioControl, 2009, 54: 85-92
- [3] Ferron P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi[J]. Annual Review of Entomology, 1978, 23(1): 409-442
- [4] Gillespie AT, Moorhouse ER. The use of fungi to control pests of agricultural and horticultural importance[A]//Whipps JM, Lumsden RD. Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth[M]. New York: Cambridge University Press, 1989: 55-84
- [5] Chen L, Li B, Pu GQ. Causes of *Spodoptera litura* resistance and control measures[J]. China Sericulture, 2009, 30(2): 16-19 (in Chinese)  
陈亮, 李兵, 浦冠勤. 斜纹夜蛾抗药性产生的原因及防治对策[J]. 中国蚕业, 2009, 30(2): 16-19
- [6] Olmert I, Kenneth RG. Sensitivity of the entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii*, and *Verticillium* sp. to fungicides and insecticides[J]. Environmental Entomology, 1974, 3(1): 33-38
- [7] Anderson TE, Roberts WD. Compatibility of *Beauveria bassiana* isolates with insecticide formulations used in colorado potato beetle (*Coleoptera: Chrysomelidae*) control[J]. Journal of Economic Entomology, 1983, 76(6): 1437-1441
- [8] Quintela ED, McCoy CW. Synergistic effect of imidacloprid and two entomopathogenic fungi on the behavior and survival of larvae of *Diaprepes abbreviatus* (*Coleoptera: Curculionidae*) in soil[J]. Journal of Economic Entomology, 1998, 91(1): 110-122
- [9] Yu HY. Defense function of *Spodoptera litura* epidermis against *Nomuraea rileyi* infection[D]. Chongqing: Master's Thesis of Chongqing University, 2011 (in Chinese)  
于海勇. 斜纹夜蛾幼虫表皮对莱氏野村菌侵染的防御功能研究[D]. 重庆: 重庆大学硕士学位论文, 2011
- [10] Qiu SX, Guan X. Impact of insecticides on conidial germination and mycelial growth of *Nomuraea rileyi*[J]. Virologica Sinica, 2000, 15(S1): 179-182 (in Chinese)



- 邱思鑫, 关雄. 杀虫剂对莱氏野村菌孢子萌发和菌丝生长的影响[J]. 中国病毒学, 2000, 15(S1): 179-182
- [11] Guo YL, Tian XJ, Luo S, Li XH. Study on the biological compatibility of *Nomuraea rileyi* with chemical pesticides[J]. Journal of Anhui Agricultural Science, 2011, 39(29): 17897-17898 (in Chinese)  
郭亚力, 田学军, 罗思, 李秀晗. 化学杀虫剂和莱氏野村菌的生物相容性研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(29): 17897-17898
- [12] Gupta SC, Leathers TD, El-Sayed GN, Ignoffo CM. Production of degradative enzymes by *Metarhizium anisopliae* during growth on defined media and insect cuticle[J]. Experimental Mycology, 1991, 15(4): 310-315
- [13] Wang SW, Ji Q, Zhu TH. Resistance of *Metarhizium rileyi* UV mutation to dichlorvos[J]. Plant Protection, 2019, 45(6): 185-191 (in Chinese)  
王诗玮, 纪琪, 朱天辉. 紫外线诱变莱氏绿僵菌对敌敌畏的耐药性[J]. 植物保护, 2019, 45(6): 185-191
- [14] Yang Y, Zhang FY, Chen Q. Study on the improved formula of PDA culture medium[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2012(4): 29-31 (in Chinese)  
杨勇, 张凤英, 陈岑. PDA 培养基改良配方的研究[J]. 酿酒科技, 2012(4): 29-31
- [15] Li SY, Lei ZR, Li CR. Effect of different media and temperatures on growth and virulence of two isolates of *Metarhizium anisopliae* from *Locusta migratoria manilensis*[J]. Journal of Yangtze University (Natural Science Edition) Agricultural Science Volume, 2007, 4(1): 4-7 (in Chinese)  
李树一, 雷仲仁, 李传仁. 培养基和温度对 2 株治蝗绿僵菌生长和毒力的影响[J]. 长江大学学报(自科版)农学卷, 2007, 4(1): 4-7
- [16] Chen H, Li P, Zheng AP, Gui Y, Wang SQ, Wang LX, Ma BT. Screening and identification of broad-spectrum chitinase-producing bacterium X2-23 against some crop pathogens and pests[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2003, 33(4): 368-372 (in Chinese)  
陈红, 李平, 郑爱萍, 桂瑶, 王世全, 王玲霞, 马炳田. 广谱抗病虫几丁质酶产生菌 X2-23 的筛选与鉴定[J]. 植物病理学报, 2003, 33(4): 368-372
- [17] Cui YS, Li LZ, Zhou XS, Yang HP, Yan J, Song YF, Wang GL, Yang YL. Preliminary study on the effects of chemical pesticides to the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii* and the application of the fungus products mixed with pesticides[J]. Forest Pest and Disease, 1997(1): 6-8 (in Chinese)  
崔永三, 李兰珍, 周新胜, 杨弘平, 阎峻, 宋友发, 王桂林, 杨彦龙. 化学农药对白僵菌的影响及菌药合用的初步研究[J]. 森林病虫通讯, 1997(1): 6-8
- [18] Zheng XL, Zheng AP, Song YY, Zhou HQ, Tan FR, Li P. Screening and identification of chitinase-producing strains against some plant pathogens[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2006, 19(3): 423-427 (in Chinese)  
郑秀丽, 郑爱萍, 宋永燕, 周华强, 谭芙蓉, 李平. 抑制真菌病害几丁质酶产生菌的筛选、鉴定[J]. 西南农业学报, 2006, 19(3): 423-427
- [19] Hong TD, Gunn J, Ellis RH, Jenkins NE, Moore D. The effect of storage environment on the longevity of conidia of *Beauveria bassiana*[J]. Mycological Research, 2001, 105(5): 597-602
- [20] Li ZH, Lin JW, Ma JC, Wu D, Zhang YJ. Influence of different drying temperatures for solid substrate after fermentation on conidia characteristics of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(7): 887-892 (in Chinese)  
李尊华, 林健文, 马金成, 吴迪, 张永军. 变温干燥固体发酵产物对球孢白僵菌分生孢子性能的影响[J]. 微生物学报, 2008, 48(7): 887-892
- [21] Li F. Pathogenicity and biology of *Nomuraea rileyi*[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2002 (in Chinese)  
李锋. 莱氏野村菌致病性和生物学特性的研究[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2002
- [22] El-Sayed GN, Ignoffo CM, Leathers TD. Effects of cuticle source and concentration on germination of conidia of two isolates of *Nomuraea rileyi*[J]. Mycopathologia, 1991, 113(2): 95-102
- [23] Kumar V, Singh GP, Kumar V, Babu AM, Datta RK. SEM study on the invasion of *Nomuraea rileyi* (Farlow) on silkworm, shape *Bombyx mori* Linn. Causing green muscardine[J]. Mycopathologia, 1997, 139(3): 141-144
- [24] Noda T, Ono M, Imure K, Araki T. Isolation of a bioactive substance from the silkworm (*Bombyx mori* Linnaeus) that accelerates the germination of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2010, 74(3): 563-568
- [25] El-Sayed GN, Coudron TA, Ignoff CM, Riba G. Chitinolytic activity and virulence associated with native and mutant isolates of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1989, 54(3): 394-403
- [26] Fang WG, Leng B, Xiao YH, Jin K, Ma JC, Fan YH, Feng J, Yang XY, Zhang YJ, Pei Y. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(1): 363-370
- [27] Zhang AW, Liu WZ, Deng CS, Wu ZK, Nong XQ. Relationship of *Beauveria bassiana* infectivity with the growing character and chitinase activity of the pathogen[J]. Chinese Journal of Biological Control, 1990, 6(4): 161-164



(in Chinese)

张爱文, 刘维真, 邓春生, 吴正铠, 农向群. 白僵菌的致病力与菌株生长特性及几丁质酶活性的关系[J]. 生物防治通报, 1990, 6(4): 161-164

- [28] Leger RJS, Cooper RM, Charnley AK. Distribution of chymoelastases and trypsin-like enzymes in five species of entomopathogenic deuteromycetes[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1987, 258(1): 123-131

- [29] Screen SE, Hu G, Leger RJS. Transformants of *Metarhizium anisopliae* sf. *anisopliae* overexpressing chitinase from *Metarhizium anisopliae* sf. *acridum* show early induction of native chitinase but are not altered in pathogenicity to *Manduca sexta*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2001, 78(4): 260-266

- [30] Wang HC, You MS. Invasion mechanism of *Metarhizium anisopliae* to insects[J]. Microbiology China, 1999, 26(1): 71-73 (in Chinese)

王海川, 尤民生. 绿僵菌对昆虫的入侵机理[J]. 微生物学

通报, 1999, 26(1): 71-73

- [31] Vargas LRB, Rossato M, Ribeiro RTDS, De Barros NM. Characterization of *Nomuraea rileyi* strains using polymorphic DNA, virulence and enzyme activity[J]. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2003, 46(1): 13-18

- [32] Xu TW. Study on UV induced mutation of *Metarhizium anisopliae* MA4 and the solid fermentation[D]. Haikou: Master's Thesis of South China University of Tropical Agriculture, 2007 (in Chinese)

许天委. 金龟子绿僵菌 MA4 的紫外诱变及其固体发酵研究[D]. 海口: 华南热带农业大学硕士学位论文, 2007

- [33] Yue SH. Ultraviolet ray mutation breeding and genetic analysis of *Beauveria bassiana* strains' degradation[D]. Baoding: Master's Thesis of Agricultural University of Hebei, 2014 (in Chinese)

岳素红. 白僵菌紫外线诱变选育及菌株退化的遗传分析[D].

保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2014

## 征订启事

### 欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 月刊, 是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 国内外公开发行人, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究改革等。

本刊为中文核心期刊, CSCD 核心期刊, 中国科技核心期刊, 曾获国家优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计, 本刊 2012 年至今以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一而蝉联“百种中国杰出学术期刊奖”, 并入选“中国精品科技期刊”, 成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2021 年每册定价 130 元, 全年 1560 元, 我们免邮费寄刊。

邮购地址: (100101)北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/WSWXTBCN>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413