

蝉虫生真菌的分离纯化及鉴定

彭湖^{1,2}, 陈金华^{1,2,3*}, 尉赟¹ (1. 西华师范大学环境科学与工程学院, 四川南充 637000; 2. 四川农业大学西南作物基因资源发掘与利用国家重点实验室, 四川成都 611130; 3. 四川农业大学小麦研究所, 四川成都 611130)

摘要 为了解蝉的寄生真菌种类, 通过分离和鉴定蝉体内虫生真菌, 观察其主要特征并对其进行分子生物学鉴定, 为蝉的绿色生物学防治提供一定的理论依据。从感染真菌的蝉体内分离纯化出几株病原真菌, 命名为 Y₁、Y₃ 和 Y₆, 并对其进行形态学观察及核糖体 DNA 序列测序及分析, 对其进行鉴定和分析。由形态学可知, 真菌 Y₁ 和 Y₃ 菌落颜色为黄棕色, 菌丝白色, 孢子黄棕色, 圆形, 大小均匀, 经过 ITS 序列比对, 结合形态特征, 其为 *Scopulariopsis alboflavescen* 属真菌。Y₆ 菌落颜色为白色, PDA 培养基上菌丝短而致密, 生长缓慢, 显微镜下观察其菌丝为无色, 孢子圆形或椭圆形, 大小均匀, 经过 ITS 序列比对, 结合形态学特征, 确定为 *Scopulariopsis* 属真菌。

关键词 蝉; 寄生真菌; 鉴定; *Scopulariopsis alboflavescen*; *Scopulariopsis*

中图分类号 S476 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2024)21-0078-04

doi: 10. 3969/j. issn. 0517-6611. 2024. 21. 016

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Isolation, Purification and Identification of Parasitic Fungi in Cicada (Hemiptera: Cicadidae)

PENG Hu^{1,3}, CHEN Jin-hua^{1,2,3}, WEI Yun¹ (1. College of Environmental Science and Engineering, China West Normal University, Nanchong, Sichuan 637000; 2. State Key Laboratory of Crop Gene Exploration and Utilization in Southwest China, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130; 3. Triticeae Research Institute, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130)

Abstract In order to understand the types of parasitic fungi in cicadas, we isolated and identified entomophytic fungi in cicadas, then observed their main characteristics, sequenced and analyzed ITS sequences of the strains. Several pathogenic fungi were isolated and purified from the cicada infected with fungi, named Y₁, Y₃, and Y₆, and their morphology was observed, ribosomal DNA sequencing and analysis were performed to identify and analyze them. Morphologically, it can be inferred that the colonies of fungi Y₁ and Y₃ are yellow brown in color, with white hyphae and yellow brown spores. They are round and uniform in size. After ITS sequence alignment and combined with morphological characteristics, they belong to the *Scopulariopsis alboflavescen* genus of fungi. The color of Y₆ colony is white, and the hyphae on PDA medium are short and dense, growing slowly. When observed under a microscope, the hyphae are colorless, and the spores are round or elliptical, with uniform sizes. After ITS sequence alignment and combined with morphological characteristics, it is classified as a *Scopulariopsis* fungus.

Key words Cicada; Parasitic fungi; Identification; *Scopulariopsis alboflavescen*; *Scopulariopsis*

蝉(*Cicadidae*)是昆虫纲, 半翅目, 蝉科(Hemiptera: Cicadidae)的昆虫。其活动范围广泛, 全球均有分布, 全世界有180个属, 2 000余个种类^[1]。在我国, 蝉科昆虫从南到北均有分布, 其危害宿主种类很多, 包括苹果树、梨树、樱桃、杏、枣、柑橘等多种果树, 杨树、柳树、榆树、茶树等观赏树木或经济作物^[2-3]。蝉是吸汁性害虫, 主要以幼虫虫态危害植物根部及幼嫩部分, 成虫虫态在树枝产卵繁殖, 严重影响林木的生长, 危害其产物的数量和品质^[2-3]。对蝉科害虫的防治方法很多, 第一类是不同化学药剂, 如吡虫啉和苦参碱、扑虱灵和氟氯氰菊酯乳油、阿维菌素乳等^[4-6]。第二类是生物防治策略, 生物防治包括天敌防治, 比如使用寄生蜂、蜘蛛、螳螂等^[7-9], 以及微生物的防治方法, 比如使用大孢巴科霉(*Batkoa major*)和球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)^[10]。化学防治方法, 虽然效率较高, 但容易对环境造成污染, 影响非靶标的生物, 包括其他昆虫和人类健康, 也可能影响天敌种群而导致害虫二次爆发。因此使用生物学的方法来防治害虫, 专一性强, 不易产生抗药性, 对人类和生态环境绿色无毒。虫生真菌寄生在特定昆虫的幼虫或成虫体内^[11], 通常对人类、非靶标生物安全无害, 而且能够在害虫中, 自然条件下广泛流

行, 因此在农业和林业害虫生物防治过程中发挥着重要作用^[12-13]。笔者分离自然界中蝉的虫生真菌, 通过形态学和分子生物学进行种类鉴定, 对进一步利用虫生真菌绿色防治蝉等害虫提供菌种资源。

1 材料与方法

1.1 样品采集 蝉的僵虫采自四川省射洪市乡村自然生长的柏树。僵虫体表布满乳黄色或白色菌丝, 使用无菌袋带回实验室。采集的僵虫在室内阴干30 d后置于无菌纸盒中, 室温条件下存放。

1.2 蝉虫生真菌寄生现象观察 用针灸针挑取蝉体表的分生孢子, 切取1小块马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA), 置于灭菌的载玻片上, 置于超净工作台的显微镜下观察。镜检发现圆形的分生孢子。

1.3 蝉虫生真菌分离 配置PDA培养基(potato dextrose agar medium), 加氨苄青霉素至终浓度为100 μg/mL。超净工作台上, 使用无菌剪刀剪一小块蝉僵虫组织, 使用75%乙醇浸泡5 s, 再用无菌水冲洗3次, 使用无菌接种环挑取孢子, 在PDA培养基上划线分离纯化, 在25℃的培养箱中培养, 通过多次划线分离单菌落, 从而获得纯培养。

1.4 菌落及菌丝、孢子形态观察 纯培养真菌在培养基上生长6 d后, 观察菌落形态。切取菌落边缘小块菌丝, 在载玻片上压片, 使用徕卡光学显微镜(Leica DMi8, 美国)观察菌丝和孢子发育情况。使用灭菌的无纺布将孢子过滤, 置于血球计数板或普通载玻片上, 利用光学显微镜进行观察。

基金项目 国家自然科学基金项目(32100163); 校科研基金项目(11A022); 博士启动基金项目(20E043)。

作者简介 彭湖(1998—), 男, 四川遂宁人, 硕士研究生, 研究方向: 病原微生物学。*通信作者, 讲师, 博士, 从事病原微生物学研究。

收稿日期 2024-02-23

1.5 PCR 扩增虫生真菌 ITS 序列及分析 将灭菌玻璃纸铺在 PDA 培养基上,接种纯化的真菌,于 25 ℃ 培养箱中培养 5~7 d,揭开玻璃纸,收获菌体,使用 CTAB 法提取真菌基因组 DNA。使用通用引物扩增真菌 rDNA 基因 ITS 序列,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列为 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'),ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')^[14],PCR 扩增体系为 50 μL,包含真菌基因组 DNA 模板 1 μL,上、下游引物各 1 μL(10 μmol/L),10×*Taq* Plus Buffer 5 μL,dNTP Mixture(2.5 mmol/L) 4 μL(天根生化科技(北京)有限公司,中国北京),*Taq* Plus DNA Polymerase(2.5 U/μL) 0.5 μL,ddH₂O 补足为 50 μL。使用 PCR 热循环仪(赛默飞,美国)进行扩增,反应程序为 94 ℃ 预变性 3 min,94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 45 s,30 个循环,最后 72 ℃ 延伸 5 min。使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,获得清晰的单一预期条带后直接送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将所获序列在 NCBI 的 GenBank 数据库中与已知序列进行 Blast 比对。选择与该试验得到的菌株相似性较高的其他真菌 ITS 序列,利用 Mega 11.0 软件进行系统分析,用邻接法(Neighbor-joining method,N-J 法)构建 ITS 序列的系统进化树^[15]。

2 结果与分析

2.1 虫生真菌形态观察 分离纯化得到了 3 个虫生真菌菌株,分别命名为 Y₁、Y₃ 和 Y₆。其中,菌株 Y₁ 在 PDA 培养基上丝状菌丝呈放射性生长,菌丝最初为白色,短而致密,生长缓慢,有分支和分隔,待菌落开始产孢后,逐渐变为黄棕色,孢子为黄棕色,菌落背面和正面颜色相同,都是黄棕色。具有 3 级分生孢子梗,孢子圆形,如图 1 所示。

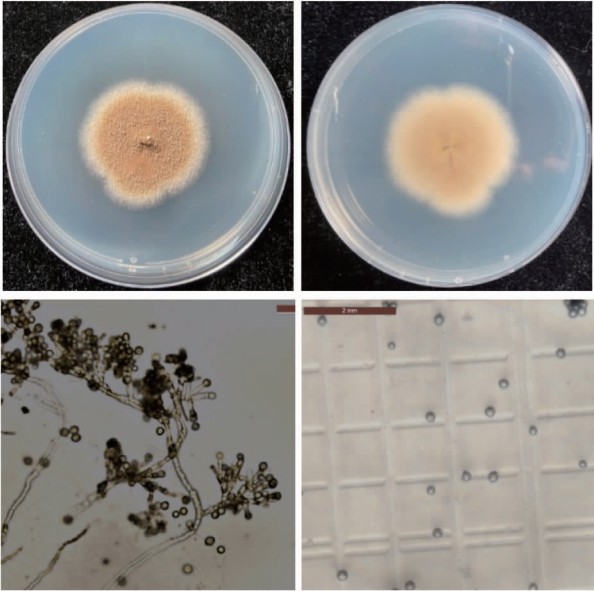


图 1 虫生真菌 Y₁ 生长 6 d 的菌落、菌丝和孢子

Fig. 1 Colonies, hyphae and spores of hyperparasitic fungus Y₁

真菌菌株 Y₃ 形态与 Y₁ 相似,在 PDA 培养基上菌丝放射性生长,最初为白色,短而致密,生长缓慢,菌丝有分支分隔,孢子为黄棕色,菌落背面也为黄棕色。具有 3 级分生孢

子梗,孢子圆形,如图 2 所示。

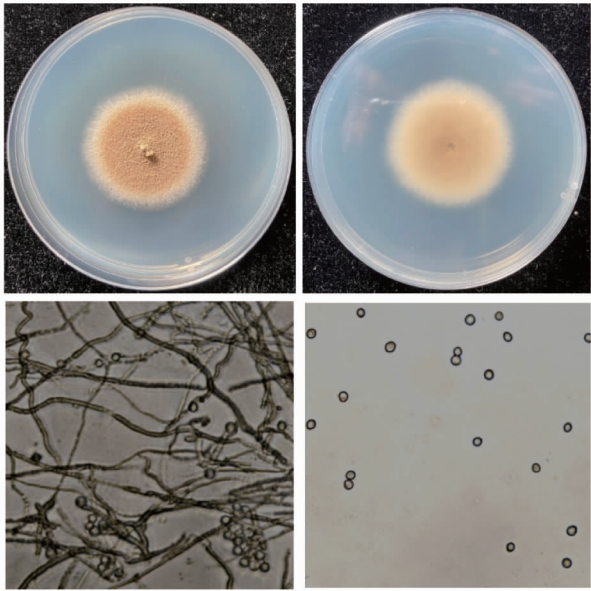


图 2 虫生真菌 Y₃ 生长 6 d 的菌落、菌丝和孢子

Fig. 2 Colonies, hyphae and spores of hyperparasitic fungus Y₃

真菌菌株 Y₆ 在 PDA 培养基上菌丝为白色,短而致密,生长缓慢,菌丝有分支分隔,孢子为白色,菌落正面背面都是白色。分生孢子发育时,分生孢子梗末端膨大,孢子圆形或椭圆形,如图 3 所示。

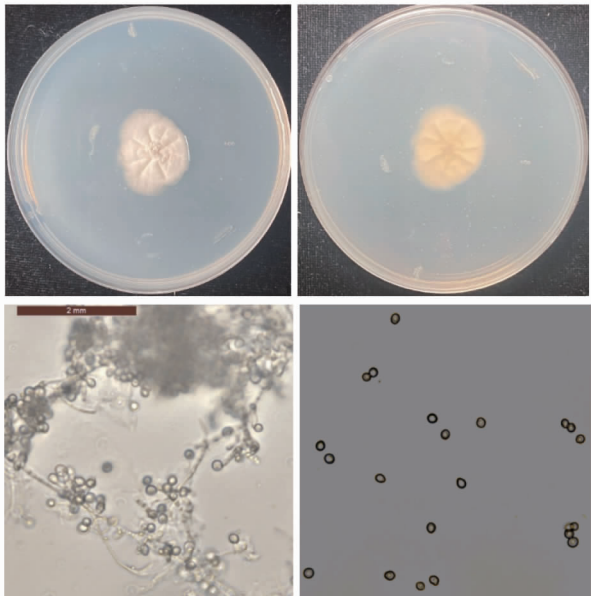


图 3 虫生真菌 Y₆ 的菌落、菌丝和孢子

Fig. 3 Colonies, hyphae and spores of hyperparasitic fungus Y₆

2.2 蝉虫生真菌的 ITS 序列 使用真菌通用引物 ITS1/ITS4 对菌株 Y₁、Y₃ 和 Y₆ 的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,均获得了大小约 600 bp 的单带,将 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。虫生真菌 Y₁ 的 ITS 序列为 609 bp,测序结果表明,与帚霉属真菌(*Scopulariopsis alboblauescens*)的相似度为 98.29%,系统进化树将真菌菌株 Y₁ 与 *S. alboblauescens* (ACCESSION NR_15620) 聚类到一支(图 4),

初步鉴定虫生真菌 Y_1 为 *S. alboflavescens* 属真菌。

虫生真菌菌株 Y_3 的 ITS 序列为 612 bp,在 NCBI 数据库中 与帚霉属真菌 *Scopulariopsis alboflavescens* 相似度为 98.45%,系统进化树将真菌菌株 Y_3 与 *S. alboflavescens* (AC-CESSION NR_15620) 聚类到一起(图 5),初步鉴定菌株 Y_3 为 *S. alboflavescens* 属真菌。

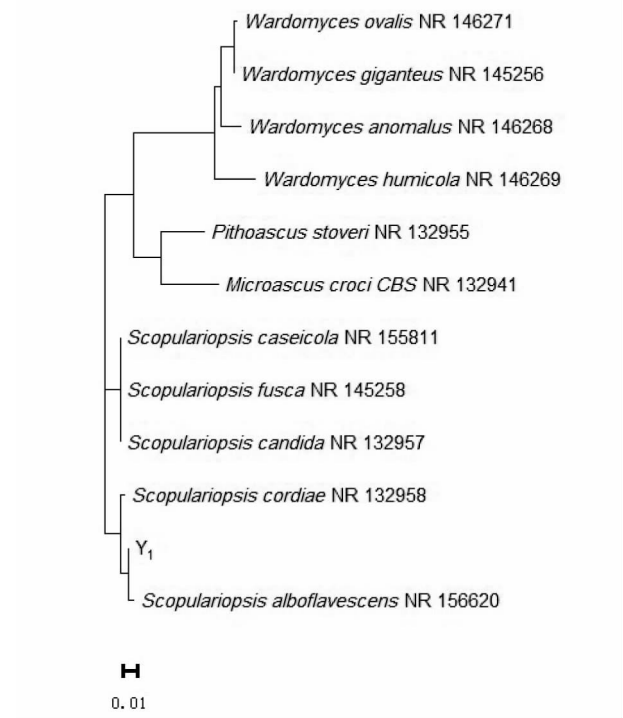


图 4 虫生真菌菌株 Y_1 及其相近菌株 ITS 的系统发育树
Fig.4 The phylogenetic tree based on ITS sequence of strain Y_1 and other related strains

虫生真菌菌株 Y_6 的 ITS 序列为 642 bp,与福斯卡帚霉 *Scopulariopsis fusca* 相似度 98.66%,与 *Scopulariopsis caseicola* 的相似性为 98.75%,系统进化树将菌株 Y_6 与 *S. caseicola* (ACCESSION NR_155811)、福斯卡帚霉 *S. fusca* (ACCESSION NR_145258) 聚类到一起(图 6),初步认定其是一种 *S. caseicola* 属的真菌。

3 讨论

该研究所获得的 3 种蝉的虫生真菌,均为帚霉属 *Scopulariopsis* 属真菌,包括 2 株 *S. alboflavescens* 菌株和 1 株 *S. caseicola* 菌株。帚霉属有性期隶属于子囊菌门 *Ascomycota*,真子囊菌纲 *Euascomycetes*,小囊菌目 *Microascales*,小囊菌科 *Microasceae*。无性期隶属于半知菌亚门 *Deuteromycontina*,丝孢纲 *Hyphomycetes*,丛梗孢目 *Hyphomycetales*,丛梗孢科 *Moniliaceae*。

Scopulariopsis 属真菌是一种自然界中广泛分布的真菌,多数不具有致病性,短帚霉(*S. brevicaulis*)可能在免疫力低下的情况下导致人类疾病^[16]。有研究发现, *S. alboflavescens* 可导致急性白血病患者的感染^[17]。邵长伦等^[18-19]使用柳珊瑚内生 *Scopulariopsis* 属真菌制作喹唑啉(quinazoline)类生物碱化合物,具有抑制肿瘤细胞的功能。*Scopulariopsis* 属真菌

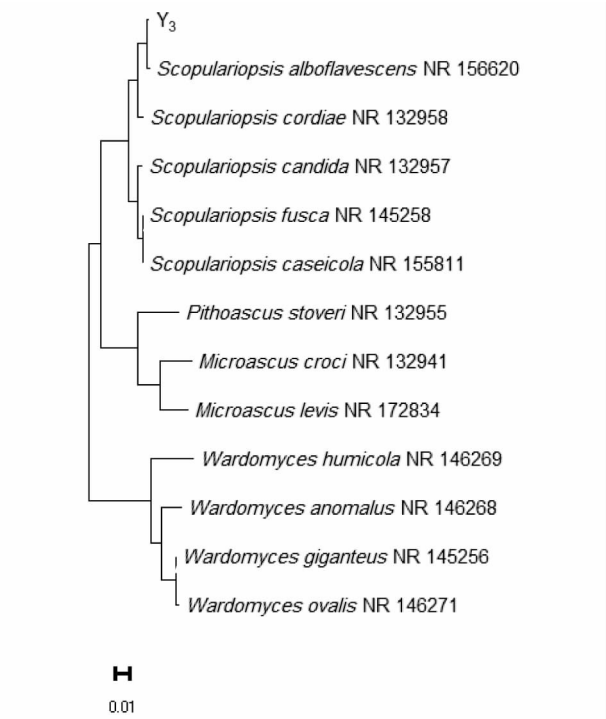


图 5 虫生真菌菌株 Y_3 及其相近菌株 ITS 的系统发育树
Fig.5 The phylogenetic tree based on ITS sequence of strain Y_3 and other related strains

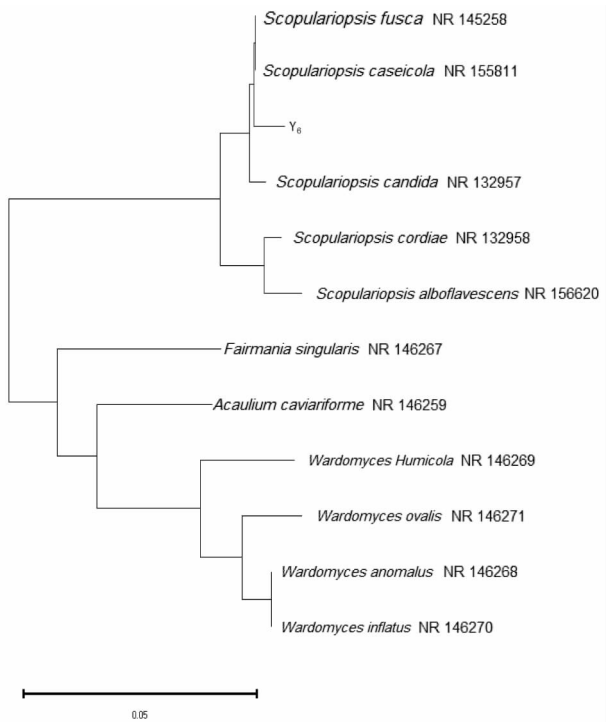


图 6 虫生真菌菌株 Y_6 及相关菌株 ITS 序列的系统发育树
Fig.6 The phylogenetic tree based on ITS sequence of strain Y_6 and other related strains

感染昆虫,有关其用于有害昆虫防治的研究目前鲜见报道。虫生真菌作为生防菌株,用于害虫防治,也越来越受到重视,并且已广泛应用于生产。白僵菌(*Beauveria bassiana*)是一种子囊菌类的虫生真菌,是最为广泛使用的昆虫生物防

治剂之一,已广泛应用于夜蛾、马铃薯块茎蛾、鞘翅目昆虫等多种害虫的防治^[19-21]。子囊菌科的绿僵菌(*Metarhizium*)被称为排名第二的昆虫病原真菌,仅次于白僵菌,寄主范围广,包括蛛形纲和大多数其他昆虫目^[22-23],已广泛用于生物农药开发应用^[24-26]。林俨等^[27]从蝉科昆虫中分离到病原菌 81 株,并对多样性进行了研究,发现寄生蝉科的真菌主要是球孢白僵菌、蝉花虫草和绿色绿僵菌等。王军等^[28]研究了秦巴山区农林作物害虫生防菌种资源,分离得到虫生真菌 187 株,为该地区虫生真菌资源的多样性研究和开发利用奠定了基础。

蝉是一种世界范围内严重的树木吸汁性害虫,需要在综合害虫管理中使用不同的方法来防控。在我国农林业发展过程中,单一树种密集种植,常常导致虫害逐年严重^[28]。该研究纯化和鉴定到的 *Scopulariopsis* 属 3 个真菌菌株均导致蝉的成虫形成僵虫,体表和体内长满菌丝和孢子,在防治蝉方面具有一定潜力。该研究丰富了生防真菌菌种资源库,将为蝉的生物防治提供新的参考依据,在农业和林业害虫防治领域具有应用前景。在今后的研究中,将从这 3 种虫生病原真菌与宿主蝉的相互作用、致病机理和实践应用等方面展开研究。

参考文献

[1] 王旭. 中国蝉亚科系统分类研究(半翅目:蝉科)[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2018:1-6.

[2] 毕守东,张书平,余燕,等. 八点广翅蜡蝉与其天敌空间关系的聚块样方方差分析[J]. 应用昆虫学报,2019,56(1): 62-71.

[3] BERGH J C,NITA M,DYER J E,et al. Spatial distribution of 17-year periodical cicada (Hemiptera: Cicadidae) exuviae and oviposition injury in Mid-Atlantic,USA Apple orchards and implications for management[J]. Crop Prot,2022,162:1-7.

[4] 楼君,滕莹,蔡晓郡,等. 柿广翅蜡蝉生物学特性及防治技术[J]. 浙江农业科学,2021,62(7):1378-1381.

[5] 高宇,张睿,遇文婧. 不同药剂对樟子松松沫蝉防治效果[J]. 东北林业大学学报,2018,46(9):93-97.

[6] 谢中平. 栗巢沫蝉防治效果试验[J]. 现代农村科技,2020(7):75.

[7] 辛蓓,MANZOOR A,曹亮明,等. 斑衣蜡蝉若虫寄生蜂地理种群遗传差异及早期快速检测[J]. 昆虫学报,2020,63(2): 218-228.

[8] LIU H P,MOTTERN J. An old remedy for a new problem? Identification of *Ooencyrtus kuwanae* (Hymenoptera:Encyrtidae), an egg parasitoid of *Lycorma delicatula* (Hemiptera:Fulgoridae) in north America[J]. J Insect Sci,2017,17(1): 1-6.

[9] KIM I K,KOH S H,LEE J S,et al. Discovery of an egg parasitoid of *Lycorma delicatula* (Hemiptera: Fulgoridae) an invasive species in South Korea [J]. J Asia Pac Entomol,2011,14(2):213-215.

[10] CLIFTON E H,CASTRILLO L A,GRYGANSKYI A,et al. A pair of native fungal pathogens drives decline of a new invasive herbivore[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2019,116(19): 9178-9180.

[11] CHARNLEY A K,COLLINSS A. Entomopathogenic fungi and their role in pest control[J]. Environmental and microbial relationships,2007,4:185-201.

[12] 蒲蛰龙,李增智. 昆虫真菌学[M]. 合肥:安徽科学技术出版社,1996:297-304.

[13] 李增智. 我国利用真菌防治害虫的历史、进展及现状[J]. 中国生物防治学报,2015,31(5):699-711.

[14] WHITE T J,BRUNS T,LEE S,et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]. New York: Academic Press,1990:315-322.

[15] NEWMAN L,DUFFUS A L J,LEE C. Using the free program MEGA to build phylogenetic trees from molecular data[J]. Am Biol Teach,2016,78(7): 608-612.

[16] SUTTON D A,RINALDI M G,SANCHE S E. Dematiaceous fungi[M]// ANAISSE E J,MCGINNIS M R,PFALLER M A. Clinical mycology. 2nd ed. Philadelphia,PA:Elsevier,2009:329-354.

[17] KURATA K,NISHIMURA S,ICHIKAWA H,et al. Invasive *Scopulariopsis alboflavescens* infection in patient with acute myeloid leukemia [J]. Int J Hematol,2018,108(6):658-664.

[18] 邵长伦,王长云,胥汝芳. 一种生物碱类化合物及其制备方法作为肿瘤细胞生长抑制剂的应用:CN201310130315. 3[P]. 2014-02-12.

[19] SHAO C L,XU R F,WEI M Y,et al. Structure and absolute configuration of fumiquinazoline L,an alkaloid from a gorgonian-derived *Scopulariopsis* sp. fungus [J]. Nat Prod,2013,76(4):779-782.

[20] AAK A,HAGE M,RUKKE B A. Biological control of *Cimex lectularius* with *Beauveria bassiana*:Effects of substrate,dosage,application strategy, and bed bug physiology [J]. Pest Manag Sci,2023,79(11): 4599-4606.

[21] ZHANG M D,WU S Y,YAN J J,et al. Establishment of *Beauveria bassiana* as a fungal endophyte in potato plants and its virulence against potato tuber moth,*Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) [J]. Insect Sci,2023,30(1):197-207.

[22] SAIF I,SUFYAN M,BABOO I,et al. Efficacy of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against wheat aphid [J]. Euro Biotech J,2024,8(1): 23-31.

[23] MASCARIN G M,KOBORI N N,DE JESUS VITAL R C,et al. Production of microsclerotia by Brazilian strains of *Metarhizium* spp. using submerged liquid culture fermentation [J]. World J Microbiol Biotechnol,2014,30(5):1583-1590.

[24] AMARESAN N A K. Beneficial microbes in agro-ecology: Bacteria and fungi[M]. Amsterdam:Academic Press,2020:593-610.

[25] RIAÑO L J G,BARRERA G P,HERNÁNDEZ L C,et al. Microsclerotia from *Metarhizium robertsii*:Production,ultrastructural analysis,robustness, and insecticidal activity[J]. Fungal Biol,2024,128(2):1643-1656.

[26] SARKER S,CHOI H W,LIM U T. Evaluation of new strain (AAD16) of *Beauveria bassiana* recovered from Japanese rhinoceros beetle: Effects on three coleopteran insects[J]. PLoS One,2024,19(1):1-13.

[27] 林俨,汪婷,张胜利,等. 蝉科昆虫病原真菌物种多样性[J]. 菌物学报,2023,42(3):663-676.

[28] 王军,张琨,张绪,等. 秦巴山区虫生真菌的分离鉴定与多样性分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2021,49(6):122-129.