

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2018.06.030

# 一株来自青藏高原土壤日本曲霉菌的 分离鉴定及其杀东亚飞蝗活性研究

查艳梅, 杨娜, 石佳杏, 陶科, 金洪, 侯太平

(四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065)

**摘要:** 采用稀释涂布法从青藏高原采集的土样中分离得到一株具有杀蝗虫活性真菌 D3-19。通过形态学观察以及 ITS 序列的分析, 初步将 D3-19 鉴定为曲霉属日本曲霉(*Aspergillus japonicus*)。室内活性测定结果表明日本曲霉 D3-19 发酵液和孢子均有杀东亚飞蝗活性。其中, 真菌发酵液对东亚飞蝗校正死亡率为: 96 h(86.67%), 144 h(100%)。与此同时, 真菌孢子悬液对东亚飞蝗的  $LC_{50}$ (致死中浓度)为  $3.42 \times 10^5$  孢子/mL。研究结果表明,  $3 \times 10^8$  孢子/mL 的 D3-19 孢子悬液对不同年龄阶段东亚飞蝗均有致死效果。其  $LT_{50}$ (半致死时间)值分别为: 羽化成虫(155 h), 四至五龄成虫(104.8 h), 三龄幼虫(54.6 h), 二龄幼虫(30.6 h)。

**关键词:** 青藏高原; 东亚飞蝗; 日本曲霉; 杀虫活性

中图分类号: S43

文献标识码: A

文章编号: 0490-6756(2018)06-1307-06

## Investigation on the insecticidal potential of *Aspergillus japonicus* D3-19 isolated from the Tibetan plateau against *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) (Orthoptera: Acrididae)

ZHA Yan-Mei, YANG Na, SHI Jia-Xing, TAO Ke, JIN Hong, HOU Tai-Ping

(Key Laboratory of Bio-resource and Eco-environment, Ministry of Education,  
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

**Abstract:** By using dilution coating method a fungus D3-19 with insecticidal activity against locusts was isolated from soil of the Qinghai-Tibet Plateau. By the morphological observation and ITS sequence analysis, D3-19 was preliminary identification as *A. japonicus*. Indoor bioassay results showed that both fermentation liquor and conidial suspension of *A. japonicus* D3-19 had insecticidal activity against *L. migratoria*. For 96 and 144 h of treatment, The corrected mortalities of the *A. japonicus* D3-19 fermentation liquor against *L. migratoria* were 86.67% and 100%, respectively. Meanwhile, the  $LC_{50}$  value of the *A. japonicus* D3-19 conidia suspension against *L. migratoria* was  $3.42 \times 10^5$  conidia/mL. The result showed that,  $3 \times 10^8$  conidia/mL conidial suspension of *A. japonicus* D3-19 had insecticidal activity against all life stages of *L. migratoria*, and the *A. japonicus* D3-19 conidia suspension against emerging adults, fourth to fifth instars, third instars larvae, and second instars larvae were 155 h, 104.8 h, 54.6 h, and 30.6 h, respectively.

**Keywords:** Tibetan plateau; *Locusta migratoria manilensis*; *Aspergillus japonicus*; Insecticidal

收稿日期: 2018-01-15

基金项目: “十三五”国家重点研发计划(2016YFC0502004)

作者简介: 查艳梅(1992-), 女, 民族: 汉, 硕士研究生, 研究方向为微生物农药。E-mail: 942436700@qq.com

通讯作者: 侯太平。E-mail: houtplab@scu.edu.cn

## 1 引言

东亚飞蝗 [*Locusta migratoria manilensis* (Meyen) (Orthoptera: Acrididae)] 属直翅目飞蝗科, 一年为两代, 第一代称为夏蝗, 第二代为秋蝗, 东亚飞蝗能形成非常高的种群密度且迁徙速度较快, 给农作物带来巨大的灾害<sup>[1]</sup>. 近年来, 由于气候干燥等自然因素和人为因素, 蝗灾爆发频率增加, 规模扩大<sup>[2]</sup>. 目前, 国内外防治蝗虫灾害的措施包括化学防治、生态防治和生物防治手段. 其中化学农药防治为主要防治手段, 化学农药防治既造成严重的环境污染、给人们的健康构成极大威胁的同时也会使蝗虫产生耐药性, 破坏生态平衡. 生物农药防治病虫害是一种绿色环保的防治手段成为当今病虫害防治的研究热点. 生物农药具有安全、不杀伤非目标生物、害虫难以产生抗药性等优点, 成为防治蝗虫最重要、最具潜力的防治措施<sup>[3,4]</sup>.

微生物杀虫剂是生物防治中较为有效的新型生物农药. 微生物产生的次级代谢产物有新颖的结构、多样的活性, 是多种药物前体的重要来源. 目前, 苏云金杆菌、假单胞杆菌、蝗虫微孢子虫、绿僵菌和白僵菌等微生物对东亚飞蝗具有较好的防治作用. 但由于生物农药自身容易降解、容易受环境因素的影响, 因此仍然需要分离得到大量的杀虫微生物来满足可持续性绿色生态农业的发展需求<sup>[5]</sup>.

青藏高原海拔较高, 地理环境和气候条件独特, 蕴含着宝贵的真菌资源, 能够分离和筛选的到具有杀虫活性的真菌<sup>[6]</sup>. 本实验从青藏高原草地土样中分离得到一株具有杀蝗虫和东亚飞蝗活性的真菌, 经过菌落形态、生理特性及分子生物学最终鉴定为日本曲霉. 室内活性测定结果表明, D3-19 发酵液和孢子均对东亚飞蝗具有较高的致死作用.

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

2.1.1 土样 供试土样来自青藏高原西藏那曲班戈, 新疆哈密巴里坤, 四川甘孜, 青海甘德等地采集的 26 份草地土壤样品. 采用对角线取样法, 用取样器采集距离表面 15cm 的土壤样于采样袋中, 除去土样中的杂质, 标记后放入 4℃ 保存备用.

2.1.2 供试虫 东亚飞蝗三龄若虫 [*Locusta migratoria manilensis*] 购于云南省昆明市蝗虫养殖基地. 饲养温度 25±5℃, 相对湿度 50% 喂食新鲜玉米草.

2.1.3 培养基 真菌分离和筛选培养基 PDA: 马铃薯 200 g, 无水葡萄糖 20 g, 琼脂粉 20 g, 蒸馏水 1000 mL, 自然 pH.

真菌发酵培养基 PDB: 马铃薯 200 g, 无水葡萄糖 20 g, 蒸馏水 1000 mL, 自然 pH.

真菌形态观察培养基(查氏培养基): 硝酸 3 g, 磷酸氢二钾 1 g, 硫酸镁(MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O) 0.5 g, 氯化钾 0.5 g, 硫酸亚铁 0.01 g, 蔗糖 30 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1000 mL, 自然 pH.

2.1.4 主要仪器和试剂 垂直送风超净工作台, 浙江苏净净化公司; HZQ-C 恒温摇床, 哈尔滨东联店子技术开发有限公司; SPX 智能生化培养箱, 宁波江南仪器厂; DSX-280KB30 蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械场; 3K15 高速冷冻离心机, 美国 Sigma 生物科技有限公司. 1× PCR buffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTP, Taq-pbus, DNA 聚合酶均购于北京六合华大基因科技有限公司. 电子显微镜观察采用日立 H-7650 扫描电子显微镜.

### 2.2 方法

2.2.1 菌株分离 土壤真菌的分离准确称取土样 10 g, 加入装有 90mL 无菌水并带有玻璃珠的 250 mL 三角瓶中, 振荡 20 min, 使土样与水充分混匀, 将细胞分散. 配制成一系列浓度梯度(1×10<sup>-1</sup>, 1×10<sup>-2</sup>, 1×10<sup>-3</sup>, 1×10<sup>-4</sup>, 1×10<sup>-5</sup>, 1×10<sup>-6</sup>, 1×10<sup>-7</sup>, 1×10<sup>-8</sup> g/mL) 土壤稀释液, 再各吸取 0.2 mL 用无菌玻璃涂布器将菌液在平板上涂抹均匀, 每个浓度梯度做三次重复, 26℃ 在真菌培养箱中培养 14 d. 多次分离纯化后获得单菌落.

2.2.2 菌株发酵液的制备 将纯化得到的菌株接种于装有 100 mL 无菌 PD 液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 160 r/min、26℃ 振荡培养 72 h 后转接至装有 200 mL 无菌 PD 液体培养基的 500 mL 三角瓶中, 接种量为 1%, 160 r/min、26℃ 振荡培养 14 d 获得真菌发酵液 5 L. 真菌发酵液用装有两层分析滤纸的布氏漏斗抽滤, 除去菌丝体, 滤液在 10000 r/min 离心 30 min. 取上清液备用.

2.2.3 真菌发酵液杀东亚飞蝗活性测定 挑选活力较好, 体型大小基本一致的 3 龄东亚飞蝗若虫饥饿处理 24 h. 采用浸虫浸草法<sup>[7]</sup>测定菌株发酵液杀虫活性. 将 3 龄东亚飞蝗若虫浸入真菌发酵液中, 1 s 后迅速取出, 放入饲养笼中, 每笼放入 15 只, 以 PD 液体培养基处理作为空白对照, 再将新鲜的黑麦草完全浸入相应浓度的药液中, 取出置于通风橱内, 沥干后放入饲养笼内(置于光照培养箱中饲养,

培养箱温度设定为 30℃、相对湿度为 50%)。每个处理设置 3 个平行实验。连续观察 120 h 内东亚飞蝗的发病及死亡情况。根据 Abbott's 公式计算其死亡率和校正死亡率。

$$\text{死亡率}(\%) = \frac{\text{死亡数}}{\text{供试虫数}} \times 100;$$

$$\text{校正死亡率}(\%) =$$

$$\frac{\text{处理组死亡率} - \text{对照组死亡率}}{1 - \text{对照组死亡率}} \times 100.$$

2.2.4 真菌不同浓度梯度孢子悬液杀东亚飞蝗活性测定 从平板上刮取一定量的真菌孢子置于灭菌的浓度为 0.05%吐温-80 无菌水中,配成浓度为  $3 \times 10^9$  孢子/mL 的孢子悬液,并稀释成  $3 \times 10^8$ 、 $3 \times 10^7$ 、 $3 \times 10^6$ 、 $3 \times 10^5$ 、 $3 \times 10^4$  孢子/mL 浓度梯度真菌孢子悬液。以健康、活动正常的 3 龄东亚飞蝗为试虫,采用浸虫浸草法,将 15 头浸渍接种真菌孢子后的蝗虫放入纱笼(25 cm×25 cm×30 cm)内,同时将喂养草料放入供试孢子悬液内浸 3s,取出晾干后放入饲养笼中。置于光照培养箱(中饲养,培养箱温度设定为 30℃、相对湿度为 50%)。每个组合处理以 0.05%吐温-80 无菌水为对照,每个处理组重复三次。每隔 12 h 观察各处理蝗虫的感染反应,记录死亡虫数,并对死亡虫体进行保湿培养(28℃,RH 50%),观察菌丝生长及产孢情况(虫尸上长出肉眼可见的菌丝以及孢子),并挑取孢子和菌丝在显微镜下镜检确定是否为日本曲霉感染致死,连续观察 8 d。按公式计算试虫的死亡率、校正死亡率和致死中浓度(LC<sub>50</sub>)。

2.2.5 真菌孢子悬液对不同年龄阶段东亚飞蝗杀虫活性测定 挑选健康的二龄,三龄,四至五龄和羽化成虫东亚飞蝗。东亚飞蝗不同年龄阶段根据王杰秀<sup>[8]</sup>划分方法进行判断。从平板上刮取一定量的真菌孢子置于灭菌的浓度为 0.05%吐温-80 无菌水中,配成浓度为  $3 \times 10^8$  孢子/mL 的孢子悬液,同一孢子浓度对不同年龄阶段蝗虫的杀虫活性测定方法参照 2.2.4。

2.2.6 菌株 D3-19 形态观察 菌落形态观察:将菌株置于查氏培养基 26℃培养 7 d 观察其菌落形态。菌株孢子形态观察:将菌株在 PDA 固体培养基上进行划线培养,并将盖玻片以 45°角插入培养基中,培养 7 d 后获得生长有菌丝体的盖玻片,将其用 2.5%的戊二醛溶液固定后,PBS 缓冲液进行洗涤,用不同浓度梯度乙醇脱水并经 CO<sub>2</sub> 临界点干燥,表面喷金后,用日立 H-7650 扫描电子显

微镜观察其菌体形态并照相。

2.2.7 菌株 D3-19 18SrDNA 的序列分析 取 D3-19 对数生长期新鲜菌液,离心收集菌丝体,参照 SDS-CTAB 法<sup>[9]</sup>提取真菌总 DNA,1%琼脂糖凝胶电泳检测。使用传统形态学鉴定和真菌 ITS(非转录序列)分析法<sup>[10]</sup>:18S rDNA 序列的扩增采用:ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3',以真菌总 DNA 为模板,反应程序如下:95℃变性 5 min;95℃30 s;55℃30 s;72℃1 min;35 个循环;72℃10 min;4℃保存。扩增 PCR 产物纯化后送北京六合华大基因科技有限公司测序。得到的 18S rDNA 序列在 Gen Bank 数据库中进行 Blast 比对。相关序列的相似性分析均在 Ez Bio Cloud 19 (<http://ez-taxon-e.ezbiocloud.net/>)网站进行,紧接着通过 MEGA 7.0 软件进行手动全局比对系统发育树的构建。

## 3 结果与分析

### 3.1 目的菌株的获得及其菌株鉴定

3.1.1 目的菌株的获得 本次研究从青藏高原地区四川省甘孜州不同经纬度采集的 6 个土样样品中分离得到 25 株真菌,其中筛选得到一株对东亚飞蝗具有较高致死活性的真菌 D3-19,土样采集地点为(N: 36° 00' 41.4" E: 98° 06' 42.9")。现保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(China General Microbiological Culture Collection Center),保藏编号为 CGMCC No. 13364。

3.1.2 目的菌株的鉴定 1) D3-19 菌株形态学特征:菌株菌落形态如图 1 所示,菌落培养初期的菌落为白色如 A 所示,后转为黑褐色如 C 所示,棉絮状,无渗出液,菌落背面如 B 所示初期为白色,后期如 D 所示呈微黄色。菌落在查氏琼脂上生长迅速,25℃培养 7 d 直径 60~70mm。D3-19 真菌孢子扫描电镜结果如图 2 所示,结果显示分生孢子头幼龄时为球形至辐射形,菌株分生孢子大量表面呈褐黑色,有渗出液;分生孢子头幼时为球形或辐射形,

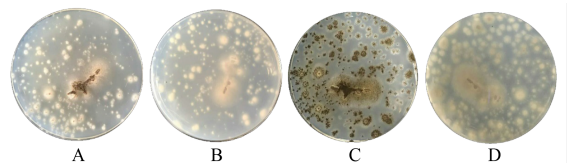


图 1 真菌 D3-19 菌落形态

Fig. 1 Micrograph of D3-19 strain

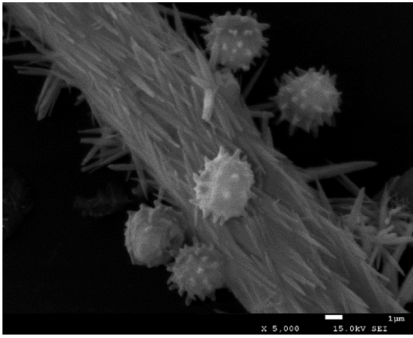


图 2 真菌 D3-19 孢子电镜照片

Fig. 2 Scanning electron micrograph of D3-19 conidia

直径 100~200 $\mu\text{m}$ ,老时分裂成几个紧密的圆柱状结构;分生孢子梗发生于基质,孢梗茎 250~600(~1000) $\mu\text{m}$  $\times$ (5~)7~12 $\mu\text{m}$ ,近顶囊的部分略带淡黄褐色,壁平滑.其形态特征与中国真菌志<sup>[1]</sup>第五卷中对日本曲霉形态学特征描述相符.2)系统发育分析:采用 SDS-CTAB 法提取菌株 D3-19 基因组 DNA,在 GenBank 数据库中通过 BLAST 程序进行

相似性比对分析,构建系统发育树(GenBank 登录号 3E74NAA4015),根据测序结果与 CNBI 数据库中进行序列比对,选择与之同源模式菌与 D3-19 进行进化树分析.如图 3 所示 D3-19 与 *Aspergillus japonicus* (AJ876880.1)、*Aspergillus aculeatus* (111412.1)和 *Aspergillus aculeatus* (KP965728.1) 同源性最高,相似度为 97%.结合形态学和分子生物学鉴定结果,最终将 D3-19 鉴定为曲霉属日本曲霉 *Aspergillus japonicus*.

3.2 真菌发酵液杀东亚飞蝗活性

真菌发酵液对东亚飞蝗室内活性测定结果如表 1 所示,结果表明,96 h 真菌发酵液对东亚飞蝗的校正死亡率为 86.67%,而此时空白对照不出现任何死亡情况.144 h 真菌发酵液对东亚飞蝗的校正死亡率高达 93.33%,而此时空白对照校正死亡率为 2.22%.综上所述,菌株 D3-19 发酵液对三龄东亚飞蝗具有较好的致死效果.

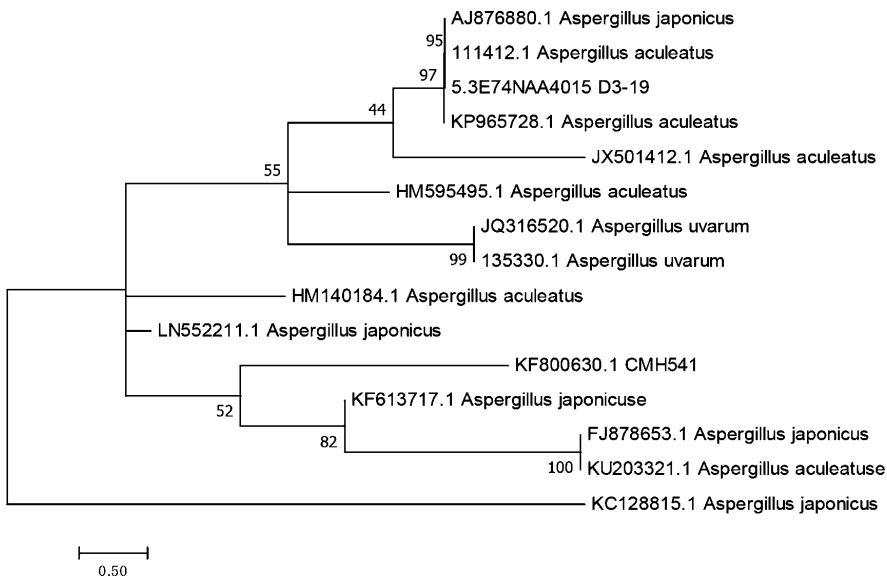


图 3 菌株 D3-19 与亲缘关系相近菌株 18S rRNA 系统发育树

Fig. 3 18S rRNA Neighbor-Joining phylogenetic tree of isolate D3-19 and related species

表 1 D3-19 真菌发酵液对东亚飞蝗毒杀活性

Tab. 1 Insecticidal activity of fungi D3-19 fermentation broth to *L. migratoria manilensis*

实验名称	校正死亡率(%)						
	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
东亚飞蝗空白组	0	0	0	0	0	0	2.22
东亚飞蝗实验组	11.11	15.56	26.67	44.44	86.67	93.33	100

3.3 菌株 D3-19 孢子毒力测定结果

3.3.1 不同浓度梯度孢子悬液对三龄蝗蛹的毒力作用 菌株 D3-19 不同浓度梯度孢子悬液对三龄蝗蛹的毒力作用如表 2 所示.从表 2 中可以看出,

不同浓度梯度孢子悬液对东亚飞蝗的致病力显著水平大于 0.01 小于 0.05,表明所设置的浓度梯度是合理的.144 h 内真菌孢子对三龄蝗蛹 LC<sub>50</sub> 值为 3.42 $\times$ 10<sup>6</sup> 孢子/mL.东亚飞蝗死亡时间与真菌孢

子剂量关系如表 3 所示. 从表中可看出, 东亚飞蝗的校正死亡率随着日本曲霉孢子悬液剂量增加而逐渐提高. 在孢子浓度为  $3 \times 10^5$  孢子/mL 时对三龄蝗蛹的致死中时比较长, 半致死时间  $LT_{50}$  值为

210.4 h. 当孢子浓度达到  $3 \times 10^9$  孢子/mL 时, 真菌孢子对东亚飞蝗表现出明显的高效致死作用, 120 h 东亚飞蝗的致死率已经接近 90%,  $LT_{50}$  值为 59.1 h.

表 2 D3-19 孢子作用于东亚飞蝗的  $LC_{50}$  和  $LC_{95}$  值

Tab. 2 The  $LC_{50}$  and  $LC_{95}$  values of the D3-19 conidia against the third instar *L. migratoria*

$LC_{50}$ (95% 置信区间)	$LC_{95}$ (95% 置信区间)	Se	$X^2$	df	p
2 (165.2~717.4) $\times 10^4$ 孢子/mL	192.6 (46.9~1773.1) $\times 10^7$ 孢子/mL	0.1	1.2	3	0.03

表 3 D3-19 不同浓度梯度孢子悬液作用于三龄东亚飞蝗的  $LT_{50}$  值

Tab. 3  $LT_{50}$  values of the D3-19 conidia at different concentration against the third instar *L. migratoria*

菌株	浓度(孢子/mL)	回归方程	标准误	$X^2$	$LT_{50}$ (h)	95% 置信区间(h)	P
D3-19	$3 \times 10^9$	$y=0.023x-1.379$	0.2	6.2	59.1	53.3~64.6	0.001
	$3 \times 10^8$	$y=0.019x-1.409$	0.1	2.5	72.7	66.4~79.0	0.001
	$3 \times 10^7$	$y=0.013x-1.288$	0.1	15.0	99.8	87.5~114.5	0.001
	$3 \times 10^6$	$y=0.008x-1.176$	0.1	9.6	142.4	124.6~171.3	0.001
	$3 \times 10^5$	$y=0.007x-1.401$	0.1	10.7	210.4	172.3~295.6	0.001

3.3.2 D3-19 真菌孢子对不同年龄段东亚飞蝗毒力作用  $3 \times 10^8$  孢子/mL D3-19 孢子悬液对不同发育阶段东亚飞蝗表现出不同的毒力效果如表 4 所示. 144 h 内, 真菌孢子对二龄东亚飞蝗校正死亡率高达 100%, 对三龄东亚飞蝗校正死亡率高达 100%. 与此同时, 192 h 内真菌孢子对四至五龄东亚飞蝗校正死亡率为 93.3%, 而对羽化成虫校正死亡率为 64.4%. 通过计算得出真菌孢子悬液对

不同发育阶段东亚飞蝗的致死中时较短, 均不超过 7 d, 其中以真菌孢子悬液对二龄和三龄的致死中时较短, 分别为 30.6 和 50.6 h, 显著低于其它年龄阶段的半致死时间. 真菌孢子对羽化成虫的半致死时间较长为 155 h, 显著高于其它年龄阶段的半致死时间. 实验结果表明二龄和三龄东亚飞蝗幼虫比其它年龄阶段的蝗虫更容易被 D3-19 孢子感染, 而羽化成虫对日本曲霉孢子悬液具有较强的抵抗作用.

表 4 D3-19 真菌孢子对不同年龄段东亚飞蝗毒力作用

Tab. 4 Effects of D3-19 conidia on the different life stages of *L. migratoria*

昆虫年龄	192h 内东亚飞蝗校正死亡率(%)								Se	$X^2$	$LT_{50}$ (h)	95% 置信区间 (h)	p
	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h	192h					
二龄	17.8	84.4	93.3	100					0.2	7.4	30.6	26.6~34.3	0.001
三龄	13.3	44.4	71.1	86.7	97.8	100			0.1	2.6	54.6	49.7~59.3	0.0001
四至五龄	11.1	17.8	28.9	40	55.6	68.9	93.3	93.3	0.1	4.6	104.8	97.0~113.2	0.0001
羽化成虫	2.2	6.7	13.3	20	28.9	40	53.3	64.4	0.2	3.4	155.0	145.9~164.2	0.001

## 4 讨论

东亚飞蝗是草地和农业上最具有代表性的害虫之一<sup>[12]</sup>. 生物农药防治蝗灾已经成为当下较好的选择. 本文从青藏高原土壤中分离得到一株真菌 D3-19, 经形态学和分子生物学鉴定, 最终确定为曲霉属的日本曲霉. 众所周知, 日本曲霉是许多酶的重要来源, 例如: 果胶酶<sup>[13]</sup>,  $\beta$ -呋喃果糖苷酶<sup>[14]</sup>, 纤维素酶<sup>[15]</sup>等. 但是目前没有笔者对其杀虫活性研究和报道. 本文首次对日本曲霉进行杀虫活性的研究, 并且发现其发酵液和孢子均具有明显

的杀虫活性, 希望能通过对该菌株进行进一步研究, 找到在杀虫方面更具有价值的杀虫活性物质.

张鹏飞等人从采自新疆的一只死亡的蝗虫体内上筛选到了一株对蝗虫具有较好触杀和胃毒作用的真菌 *Aspergillus oryzae* XJ-1, 在感染后第 10 天, 该菌对东亚飞蝗 3 龄幼虫的  $LC_{50}$  为  $3.3 \times 10^8$  孢子/mL<sup>[16]</sup>. 丁秀琼等从自然病死、全身发黑的蝗虫尸体中成功分离到一株产碱杆菌 (*Caligenes* sp.), 室内活性测定结果显示致死中浓度为  $LC_{50}$  为  $1.33 \times 10^8$  孢子/mL<sup>[17]</sup>. 陶勇等从土壤中筛选得到一株对蝗虫有较高致死率的产几丁质酶的细菌

*Sanguibacter* sp. C4, 将其菌液饲喂蝗虫, 死亡率为 61.1%<sup>[18]</sup>. 本次实验研究表明, 日本曲霉 D3-19 孢子对三龄蝗蛹 LC<sub>50</sub> 值为 3.42×10<sup>6</sup> 孢子/mL. 通过与上述结果比较表明, 日本曲霉 D3-19 具有较高的东亚飞蝗致死活性, 为蝗虫灾害的微生物防治提供了一种高效的生防菌.

本次实验结果表明随着东亚飞蝗虫龄期的增长, 虫体自身对日本曲霉孢子的抵抗能力增强, 这可能与东亚飞蝗各发育阶段的不同解毒机制有关. 研究表明, 害虫代谢解毒和靶标部位不敏感等抗性机制的表达均与害虫的生长发育阶段相关<sup>[19,20]</sup>. 在日本曲霉孢子防治东亚飞蝗室内活性实验中, 通过对不同年龄阶段东亚飞蝗防效的比较表明东亚飞蝗幼虫时期为最佳防治时期, 为制定新的东亚飞蝗治理策略提供了基础资料.

#### 参考文献:

[1] Guo W, Wang X, Ma Z, *et al.* CSP and takeout genes modulate the switch between attraction and repulsion during behavioral phase change in the migratory locust [J]. *Plos Genetics*, 2011, 7: e1001291.

[2] Kang L, Chen X, Zhou Y, *et al.* The analysis of large-scale gene expression correlated to the phase changes of the migratory locust [J]. *Proc Nati Acad Sci USA*, 2004, 101: 17611.

[3] Ma E B, He Y P, Zhu K Y. Comparative studies of *acetylcholinesterases* purified from two field populations of the oriental migratory locust (*Locusta migratoria manilensis*): implications of insecticide resistance [J]. *Pesti Biochem Physiol*, 2004, 78(1): 67.

[4] 彭国雄. 杀蝗绿僵菌生物农药研制及其应用技术研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2008.

[5] Lomer C J, Bateman R P, Johnson D L, *et al.* Biological control of locusts and grasshoppers [J]. *Annu Rev Entomol*, 2001, 46: 667.

[6] 刘宏伟. 青藏高原特殊生境真菌次级代谢产物结构与功能的研究[C]//中国菌物学会 2015 年学术年会论文摘要集, 2015.

[7] 张宗炳. 杀虫药剂的毒力测定[M]. 上海: 上海科

学技术出版社, 1959.

[8] 王杰秀. 如何防治蝗虫危害[M]. 北京: 石油工业出版社, 2009.

[9] Hanada R E, Pomella A W, Costa H S, *et al.* Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuáú) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease [J]. *Fungal Biol*: UK, 2010, 114: 901.

[10] Borneman J, Hartin R J. PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66: 4356.

[11] 齐祖同. 中国真菌志. 第五卷, 曲霉属及其相关有性型[M]. 北京: 科学出版社, 1997.

[12] Matteson P C. A review of field studies of the environmental impacts of locust/grasshopper control programmes in Africa [M]//Lomer C J, Prior C. In biological control of Locusts and Grasshoppers. Wallingford: CAB International, 1992: 347.

[13] 单杨, 夏金兰, 李培骏, 等. 一株产果胶酶制剂的日本曲霉(*Aspergillus japonicus*) PJ01 及产酶方法: CN103468582A [P]. 2013-07-09.

[14] 赵秀红, 李长彪, 刘长江, 等. 日本曲霉产 β-呋喃果糖苷酶的性质研究[J]. *生物技术*, 2006, 16: 33.

[15] 王义甫, 唐桂馥, 陈源, 等. 一种曲霉纤维素酶菌种的制备方法: CN1062167 [P]. 1992-06-24.

[16] 张鹏飞. 一种新昆虫病原真菌 *Aspergillus oryzae* XJ-1 及其在蝗虫防治中的潜力[D]. 北京: 中国农业大学, 2015.

[17] 丁秀琼. 一株蝗虫病原菌的分离鉴定及其毒力研究[D]. 成都: 四川大学, 2007.

[18] 陶勇. 一株产几丁质酶细菌的鉴定 酶的性质及其基因的克隆与表达[D]. 成都: 四川大学, 2006.

[19] 张文吉, 张友军. 棉铃虫不同龄期幼虫羧酸酯酶、谷胱甘肽 S-转移酶、乙酰胆碱酯酶研究[J]. *植物保护学报*, 1996, 23: 157.

[20] Patil T N, Aad ei fattah A S A, Plapp F W, *et al.* ATPase and Dehydrogenase Activities from House Flies Susceptible and Resistant to *Organochlorine* Insecticides [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 1980, 13: 5.

#### 引用本文格式:

中文: 查艳梅, 杨娜, 石佳杏, 等. 一株来自青藏高原土壤日本曲霉菌的分离鉴定及其杀东亚飞蝗活性初步研究 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2018, 55: 1307.

英文: Zha Y M, Yang N, Shi J X, *et al.* Preliminary investigation on the insecticidal potential of *Aspergillus japonicus* D3-19 isolated from the Tibetan plateau against *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) (Orthoptera: Acrididae) [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2018, 55: 1307.