

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2374—2009

---

### 绿僵菌、白僵菌生物农药检验操作规程

Protocol of inspection for biopesticides of *Metarhizium* and *Beauveria*

2009-09-02 发布

2010-03-16 实施

---

中华人民共和国  
国家质量监督检验检疫总局 发布

## 前 言

本标准的附录 B 为规范性附录,附录 A、附录 C、附录 D、附录 E 及附录 F 均为资料性附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准由中华人民共和国重庆出入境检验检疫局和重庆大学生物工程学院负责起草。

本标准主要起草人:王国民、李应国、周启明、李贤良、王中康、殷幼平、李正国、孔德英。

本标准为首次发布的出入境检验检疫行业标准。

## 绿僵菌、白僵菌生物农药检验操作规程

### 1 范围

本标准规定了进出口绿僵菌(*Metarhizium*)和白僵菌(*Beauveria*)生物农药的抽样和品质检验方法。

本标准适用于绿僵菌(*Metarhizium*)和白僵菌(*Beauveria*)生物农药的母药、油悬浮剂、可湿性粉剂等生物农药产品的抽样与检验。

### 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用本标准。然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

- GB/T 1601 农药 pH 值的测定方法
- GB/T 1605 商品农药采样方法
- GB/T 5451 农药可湿性粉剂润湿性测定方法
- GB/T 8170 数值修约规则与极限数值的表示和判定
- GB/T 14825 农药悬浮率测定方法
- GB/T 16150 农药粉剂、可湿性粉剂细度测定方法

### 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

#### 3.1

##### 分生孢子 **conidium**

真菌无性繁殖从分生孢子梗顶端或侧面产生并且成熟时脱落的单细胞或多细胞的孢子。

#### 3.2

##### 含孢量 **quantity of conidium**

每毫升油悬浮剂或每克粉剂所含真菌孢子的数量,用于表示真菌的有效成分。

#### 3.3

##### 活孢率 **percentage of living conidium**

即孢子萌发率,指在一定培养条件下萌发的真菌孢子数占总孢子数的百分率。

#### 3.4

##### 杂菌率 **percentage of untarget microorganism**

被测真菌生物农药中除了活性组分真菌外其他真菌量占总菌量的含量。

#### 3.5

##### 贮存稳定性 **stability of storage**

在一般室温或高于室温下贮存一定时间后,产品保持活菌率比标明值的相对水平。

#### 3.6

##### LC<sub>50</sub>

杀死生物种群半数(50%)所需用的浓度(median lethal concentration,个孢子/mL)。

### 3.7

#### LD<sub>50</sub>

杀死生物种群半数(50%)所需用的剂量(median lethal concentration, 个孢子/g)。

### 3.8

#### LT<sub>50</sub>

杀死生物种群半数(50%)所需用的时间(median lethal time, 天)。

## 4 抽样

### 4.1 抽样工具及用品

抽样前预先准备好自封式塑料袋(或塑料瓶)、金属勺、剪刀、封口胶带、标签、牛皮纸封样袋、抽样封条和胶水。

### 4.2 抽样方法与数量

按照 GB/T 1605 进行,抽样过程

### 4.3 样品的标识

抽取的样品在样品袋上贴上抽样标签和抽样封条,并注明报验号、样品名称、数量、规格、抽样人姓名、抽样日期。所抽样品一份留存被抽样单位,一份送实验室检测。

### 4.4 样品保存

保存样品不少于 500 g(或 500 mL),保存时间 6 个月~12 个月。

## 5 检验

### 5.1 菌种鉴定

5.1.1 绿僵菌在现代真菌分类系统中分类地位属于子囊菌门(Ascomycota)、有丝分裂孢子真菌(*Mitosporic fungi*)、绿僵菌属(*Metarhizium*)。

5.1.2 白僵菌在现代真菌分类系统中分类地位属于子囊菌门(Ascomycota)、有丝分裂孢子真菌(*Mitosporic fungi*)、白僵菌属(*Beauveria*)。

5.1.3 菌种鉴定目前主要依据传统形态学特征和生态产孢特征(参见附录 A)。当发生争议时,可采用 18 rDNA 的 ITS 序列进行分子鉴定(参见附录 B)。(见附录 B)

### 5.2 含孢量测定

#### 5.2.1 方法提要

使用光学显微镜和血球计数板测定孢子悬液中的孢子数量,计算含孢量。

#### 5.2.2 试剂和材料

煤油。

#### 5.2.3 仪器

5.2.3.1 光学显微镜。

5.2.3.2 天平:感量 0.01 g。

5.2.3.3 纽鲍尔(Neubauer)血球计数板:小方格容积 0.000 25 mm<sup>3</sup>。

5.2.3.4 可调移液器:0.2 mL~5.0 mL。

5.2.3.5 磁力搅拌器:无级调速,100 r/min~5 000 r/min。

5.2.3.6 容量瓶:100 mL。

#### 5.2.4 测定步骤

##### 5.2.4.1 样品处理

##### 5.2.4.1.1 油悬浮剂样品

将样品搅拌均匀后,准确吸取 1.00 mL 孢子悬浮液至 100 mL 容量瓶中,用煤油稀释定容至

100 mL。摇匀后从中取出 1.0 mL 稀释液至 100 mL 容量瓶中,用煤油稀释定容,作待检液。

#### 5.2.4.1.2 粉剂、可湿性粉剂和母药样品

称取 1 g(精确至 0.01 g)样品于洁净干燥的烧杯中,加入 20 mL 煤油制成孢子悬浮液,用磁力搅拌器搅拌混匀后,转移至 100 mL 容量瓶中,用煤油稀释定容。摇匀后从中取出 1.0 mL 于 100 mL 容量瓶中,用煤油稀释定容,作待检液。

#### 5.2.4.2 测定

盖好血球计数板的盖玻片,将待测样品摇匀后立即用移液器吸取待检液 0.2 mL,使待检液从盖玻片缝隙中进入血球计数板,静置 3 min 后在光学显微镜 10×40 倍下镜检,计数 80 个小方格中孢子总数。重复 3 次,取平均值  $n_1$ 。

#### 5.2.5 计算

试样的含孢量按式(1)计算:

式中:

$W_1$ ——含孢量,单位为个孢子/mL 或个孢子/g;

$n_1$ ——一个小方格的孢子总数,单位为个。

### 5.3 活孢率测定

#### 5.3.1 方法提要

将混匀的生物农药用色拉油稀释至 100 mL 容量瓶中,用移液器吸取 0.2 mL 涂布于平板上,接种后在 25℃±1℃下保湿培养 24 h,观察萌发孢子与未萌发孢子。

#### 5.3.2 试剂和材料

5.3.2.1 食用色拉油。

5.3.2.2 蛋白胨:生化试剂。

5.3.2.3 酵母浸膏:生化试剂。

5.3.2.4 琼脂粉:生化试剂。

5.3.2.5 葡萄糖:分析纯。

5.3.2.6 蔗糖:分析纯。

#### 5.3.3 仪器

5.3.3.1 光学显微镜。

5.3.3.2 天平:感量 0.001 g。

5.3.3.3 超净工作台。

5.3.3.4 恒温箱(5℃~60℃)。

5.3.3.5 高压灭菌锅。

5.3.3.6 可调移液器:100 μL~1 000 μL。

#### 5.3.4 测定步骤

##### 5.3.4.1 配制培养基(配方参见附录 C)

取各物质加入 80 mL 蒸馏水中,调整 pH 值至 6.5 左右,用蒸馏水定容至 100 mL;然后在高压灭菌锅中于 121℃ 高压灭菌 30 min,倒入直径 9 cm 培养皿中(每皿约 15 mL),冷却后在无菌条件下放入经灭菌的直径为 15 mm 的玻璃纸圆片。

##### 5.3.4.2 接种

移取 1.00 mL 油悬浮剂样品或称取 1 g(精确至 0.001 g)孢子粉于 10 mL 色拉油中,在旋涡混合器上混合均匀,用接种环沾取孢子悬浮液涂在玻璃纸圆片上,并用玻璃推推匀。

##### 5.3.4.3 培养计数

将接种后的培养基平板置于恒温箱 25℃±1℃ 保湿培养 24 h 后,取出玻璃纸圆片镜检,计数视野

中萌发(孢子萌芽长度大于孢子半径)孢子数及孢子总数(孢子总数不得少于 300 个)。重复 3 次,取平均值。

5.3.5 计算

试样的活孢率按式(2)计算:

$$W_2 = \frac{n_2}{n_3} \times 100 \dots\dots\dots(2)$$

式中:

- $W_2$ ——活孢率,%;
- $n_2$ ——萌发孢子数,单位为个;
- $n_3$ ——检查孢子总数,单位为个。

5.4 杂菌率测定

5.4.1 方法提要

将混匀的生物农药用煤油稀释均匀后镜检,根据绿僵菌和白僵菌分生孢子的形态特征及大小分别记录目标真菌的分生孢子数及非目标真菌分生孢子数,计算杂菌率。

5.4.2 试剂和材料

煤油。

5.4.3 仪器

- 5.4.3.1 光学显微镜。
- 5.4.3.2 天平:感量 0.01 g。
- 5.4.3.3 可调移液器:0.2 mL~5.0 mL。
- 5.4.3.4 纽鲍尔(Neubauer)血球计数板:小方格容积 0.000 25 mm<sup>3</sup>。
- 5.4.3.5 磁力搅拌器:无级调速,100 r/min~5 000 r/min。
- 5.4.3.6 容量瓶:100 mL。

5.4.4 测定步骤

5.4.4.1 样品处理

按照 5.2.4.1 将样品制备成待检液。

5.4.4.2 真菌计数

盖好纽鲍尔(Neubauer)血球计数板的盖玻片,用可调移液器吸取 0.2 mL 待检液,使之从盖玻片缝隙中进入血球计数板,静置 3 min 后在光学显微镜 10×40 倍下镜检,计数 80 个小方格中孢子目标真菌的分生孢子数、非目标真菌分生孢子数。重复 3 次,取平均值。

5.4.5 计算

试样的杂菌率按式(3)计算:

$$W_3 = \frac{n_2}{n_1 + n_2} \times 100 \dots\dots\dots(3)$$

式中:

- $W_3$ ——杂菌率,%;
- $n_1$ ——目标真菌分生孢子数,单位为个;
- $n_2$ ——非目标真菌分生孢子数,单位为个。

5.5 生物活性测定

5.5.1 方法提要

由于真菌生物农药不同菌株有不同专化性,进行生物活性测定时应以登记的靶标害虫作为生物活性测定的试虫。本标准以东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* (Mey.)、铜绿丽金龟 *Anomala corpulenta* 作为试虫,分别用点滴法、土壤混药法测定绿僵菌生物农药的毒力效价;以桃蚜 *Myzua persicae*

*Sulzers*、马尾松毛虫 *Dendrolimus punctatus* 作为试虫分别用浸虫法、点滴法测定白僵菌生物农药的毒力效价(东亚飞蝗、铜绿丽金龟、桃蚜和马尾松毛虫的饲养方法参见附录 D)。

### 5.5.2 试剂和材料

5.5.2.1 东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* (Mey.) 4 龄蝗蛹。

5.5.2.2 铜绿丽金龟 *Anomala Corpulenta* 2 龄幼虫。

5.5.2.3 桃蚜 *Myzu persicae* *Sulzers* 成虫。

5.5.2.4 马尾松毛虫 *Dendrolimus punctatus* 3 龄幼虫。

5.5.2.5 麦苗:5 片~6 片叶以上。

5.5.2.6 发芽玉米。

5.5.2.7 甘蓝苗:3 片~4 片叶。

5.5.2.8 松针。

5.5.2.9 麦麸。

5.5.2.10 酵母粉。

5.5.2.11 吐温-80。

### 5.5.3 仪器与用具

5.5.3.1 各种饲虫箱。

5.5.3.2 光学显微镜。

5.5.3.3 磁力搅拌器:无级调速,1 000 r/min~5 000 r/min。

5.5.3.4 纽鲍尔(Neubauer)血球计数板。

5.5.3.5 可调移液器:0.1 μL~10 μL。

5.5.3.6 可调移液器:200 μL~1 000 μL。

5.5.3.7 烧杯:100 mL。

### 5.5.4 测定步骤

参见附录 E。

## 5.6 干燥减量测定

### 5.6.1 方法提要

将测试样品在 105 °C ± 2 °C 干燥箱中干燥恒重,通过前后质量之差计算干燥减量。

### 5.6.2 仪器

5.6.2.1 电热鼓风干燥箱。

5.6.2.2 干燥器。

5.6.2.3 天平:感量 0.001 g。

5.6.2.4 扁型称量瓶:40 mm。

### 5.6.3 操作方法

将扁型称量瓶烘至恒重( $m_1$ ),装入约 10 g(精确至 0.001 g)混匀试样后一起称量( $m_2$ ),在 105 °C ± 2 °C 的电热恒温烘箱中烘 1 h,取出立即放入干燥器中冷却至室温,称量( $m_3$ )。

### 5.6.4 计算

试样的干燥减量按式(4)计算:

$$W_4 = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100 \quad \dots\dots\dots (4)$$

式中:

$W_4$ ——干燥减量, %;

$m_1$ ——扁型称量瓶质量,单位为克(g);

$m_2$ ——烘前样品与扁型称量瓶质量,单位为克(g);

$m_3$ ——烘后样品与扁型称量瓶质量,单位为克(g)。

5.7 pH 值测定

按 GB/T 1601 进行。

5.8 贮存稳定性测定

5.8.1 方法提要

将待测样品密闭置于 38℃±2℃ 下贮存 14 d, 然后按照 5.3 测定活孢率。

5.8.2 仪器

5.8.2.1 恒温箱(或恒温水浴): 温度 38℃±2℃。

5.8.2.2 具塞塑料离心管: 50 mL, 在 38℃ 下, 仍能充分保证其密封性。

5.8.2.3 光学显微镜。

5.8.2.4 超净工作台。

5.8.2.5 天平: 感量 0.001 g。

5.8.3 测定步骤

用可调移液器量取 1.00 mL 油悬浮剂样品(或称取质量精确至 0.001 g)试样放入 50 mL 塑料离心管中, 使其铺成平滑均匀层, 置塑料离心管于 38℃ 恒温箱中放置 14 d。取出使试样冷至室温。于 24 h 内完成对活孢率( $n_1$ )的检验。活孢率测定方法同 5.3。

5.8.4 计算

贮存稳定性按式(5)计算:



..... (5)

式中:

$W_5$ ——贮存稳定性, %;

$n_1$ ——活孢率, %;

$n$ ——待测样品贮存前的活孢率测定值。

5.9 细度测定

对于粉剂和可湿性粉剂样品按 GB/T 14825 中的“干筛法”和“湿筛法”进行细度测定。

5.10 润湿性

对可湿性粉剂按 GB/T 5450 进行测定。

5.11 悬浮率测定

对于油悬浮剂参照附录 F 的方法测定。对于粉剂、可湿性粉剂按 GB/T 14825 进行“悬浮率”测定。

6 数据处理

极限数值的处理, 采用 GB/T 8170 中的修约值比较法。



## 附录 A

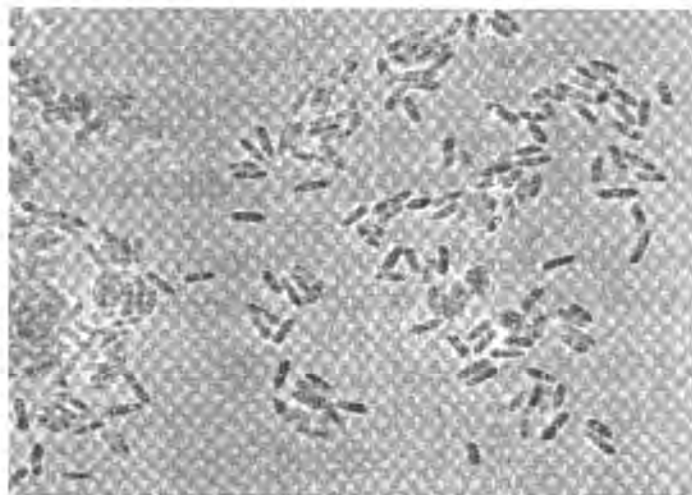
(资料性附录)

## 绿僵菌属、白僵菌属常见种的主要形态特征

## A.1 绿僵菌属常见种主要形态特征

A.1.1 金龟子绿僵菌[*Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokinvar]

在 PDA 及察氏培养基上菌落绒毛状至棉絮状。最初白色,产孢时橄榄绿色。菌丝具分隔和分枝,透明,直径为  $1.5\ \mu\text{m}\sim 2\ \mu\text{m}$ 。分生孢子梗很难与菌丝区别,直径约  $2\ \mu\text{m}$ ,其末端产生瓶形小梗,  $(8.6\ \mu\text{m}\sim 25\ \mu\text{m})\times(1.5\ \mu\text{m}\sim 2.2\ \mu\text{m})$ 。分生孢子单细胞,长椭圆形至圆柱状,两端钝截形或钝圆,大小变化甚大,  $(5.7\ \mu\text{m}\sim 9\ \mu\text{m})\times(2.3\ \mu\text{m}\sim 4.5\ \mu\text{m})$ 。金龟子绿僵菌被 Tulloch 分为 2 个变种:金龟子绿僵菌小孢变种(*M. anisopliae* var. *anisopliae*)和金龟子绿僵菌大孢变种(*M. anisopliae* var. *majus*) (见图 A.1)。

图 A.1 金龟子绿僵菌大孢变种(*M. anisopliae* var. *majus*)的分生孢子A.1.2 黄绿绿僵菌(*M. flavoviride* Gams & Rozsypal)

在察氏平板上,14 d 时菌落直径达 55 mm,黄绿色。分生孢子梗疏松轮状分枝,其上着生(1~2)杆状瓶梗,与分生孢子梗成宽的夹角,顶部急尖  $(7.0\ \mu\text{m}\sim 12\ \mu\text{m})\times(1.8\ \mu\text{m}\sim 3\ \mu\text{m})$ 。分生孢子单细胞,广卵圆形,具有不同的顶端,  $(7.2\ \mu\text{m}\sim 9.3\ \mu\text{m})\times(3\ \mu\text{m}\sim 4\ \mu\text{m})$ ,两端钝截形或钝圆,大小变化甚大,  $(5.7\ \mu\text{m}\sim 9\ \mu\text{m})\times(2.3\ \mu\text{m}\sim 4.5\ \mu\text{m})$ 。在 PDA 琼脂培养基上,菌落开始白色,后变成淡绿色,生长较弱。分生孢子梗瓶形,分生孢子长椭圆形至短柱形。黄绿绿僵菌(见图 A.2)分为 2 个变种:黄绿绿僵菌小孢变种(*M. flavoviride* var. *minus*)和黄绿绿僵菌大孢变种(*M. flavoviride* var. *flavoviride*)。

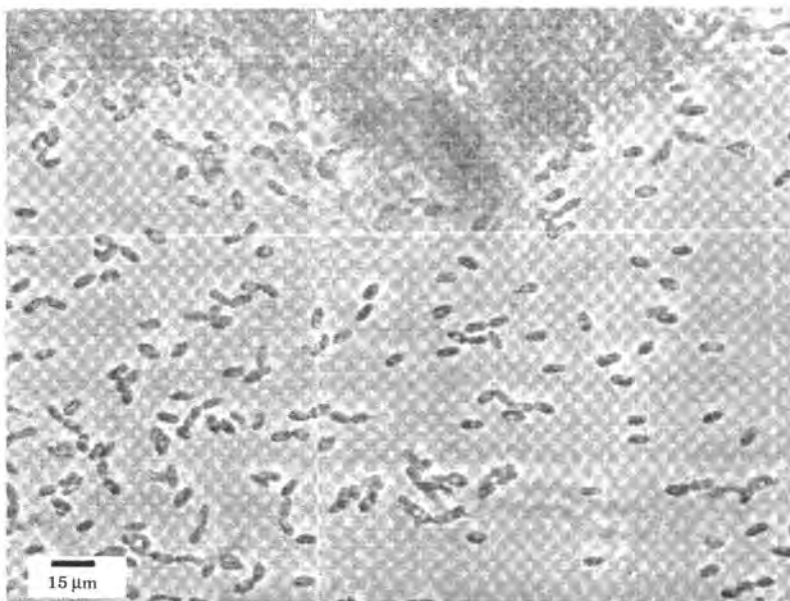


图 A.2 黄绿绿僵菌(*M. flavoviride*)的分生孢子

A.1.3 戴氏绿僵菌(*M. taii* Liang & Liu)

戴氏绿僵菌是本属中唯一发现具有性型的种,其有性型为戴氏虫草(*Cordyceps taii*)。瓶梗柱状,具短尖(8.4 μm~20 μm)×(1 μm~1.5 μm),单生于气生菌丝或紧密地轮生于分生孢子梗及原瓶梗上,也可通过微循环产孢从次生子囊孢子产生。分生孢子柱状,中部稍缢缩,两端圆形,分生孢子大小约为13 μm×3 μm,由微循环产孢形成的分生孢子,其形状与前者基本相同,大小约为(7.2 μm~9 μm)×2.5 μm。

A.2 白僵菌属常见种的主要形态特征

A.2.1 球孢白僵菌[*Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin]

菌丝细长,直径1.5 μm~2.0 μm,丝状有隔;菌落平坦粉末状,表面白色或灰色。产孢细胞基部形状,从典型的瓶状到丝状,垂直着生于菌丝分支或短的小分枝上;分生孢子着生在之字形产孢细胞梗上;孢子多数为球形,直径2.0 μm~4.0 μm。球孢白僵菌 PDA 培养基上的萌发见图 A.3。

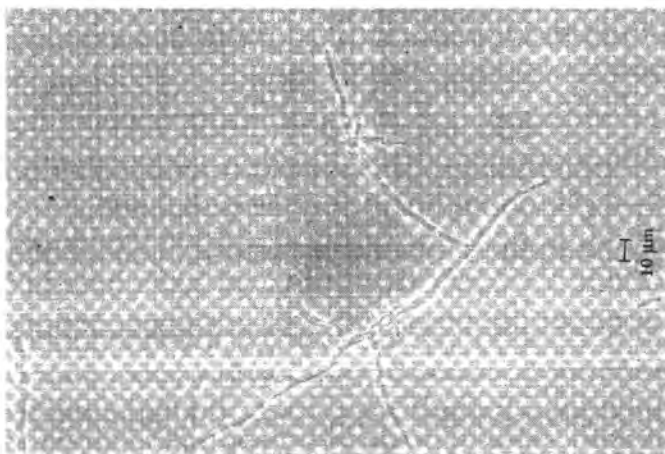


图 A.3 球孢白僵菌 PDA 培养基上的萌发

### A. 2.2 卵孢白僵菌 [*Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch]

菌落絮状、茸毛状或粉状，表面白色浮白色或淡黄色，能使某些受感染的昆虫变成粉红色或紫色，也可使明胶培养基的边缘变为红色或紫红色。菌丝细长透明有隔，产孢细胞形状不定，瓶状或丝状，垂直着生在主轴菌丝上或短的分枝上，形成一个球形的产孢细胞束。分生孢子(见图 A. 4)卵圆或椭圆形( $2.0\ \mu\text{m}\sim 6.0\ \mu\text{m}$ ) $\times$ ( $1.5\ \mu\text{m}\sim 3.0\ \mu\text{m}$ )，孢子着生在由产孢细胞顶部延伸而成的之字形丝状结构上。

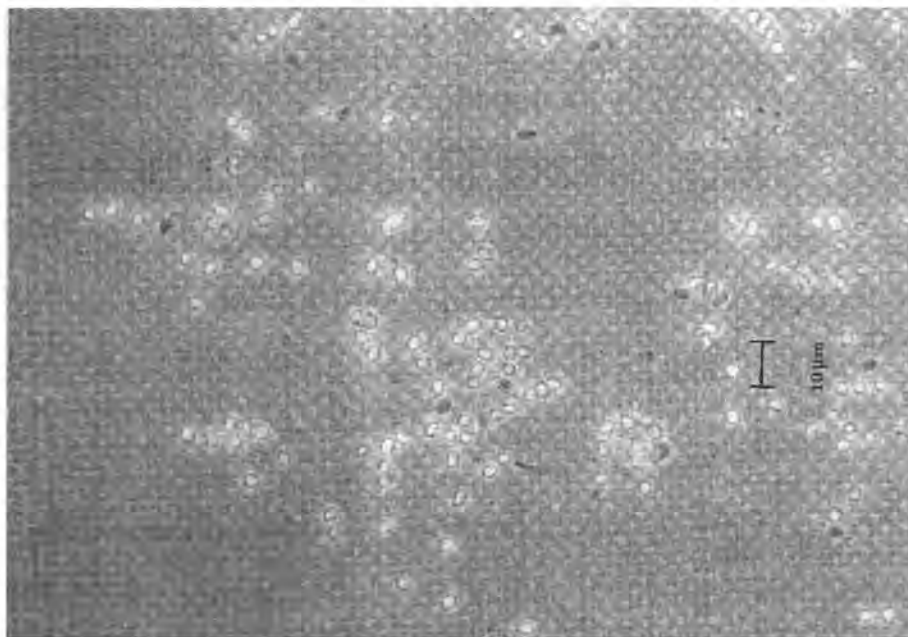


图 A. 4 卵孢白僵菌(*Beauveria brongniartii*)的分生孢子

### A. 2.3 白色白僵菌 [*Beauveria album* (Limber) Saccas]

菌丝透明有隔，常在隔附近有分枝，分支细长 $1\ \mu\text{m}\sim 2\ \mu\text{m}$ 粗。分生孢子梗垂直生于菌丝上，顶端生有2个~4个轮生的产孢细胞或产孢细胞直接着生于菌丝上。孢子着生在之字形产孢梗。孢子透明，球形或卵圆形( $1.6\ \mu\text{m}\sim 2.5\ \mu\text{m}$ ) $\times$ ( $1.7\ \mu\text{m}\sim 3.2\ \mu\text{m}$ )。菌落纯白色，椭圆形，表面絮状，边缘规则。

### A. 2.4 双型白僵菌 [*Beauveria amorpha* (Hohnel) Sam son & Evans]

在成熟的菌丝上，由多个产孢细胞形成一个轮状结构；产孢细胞基部膨大，直径 $2\ \mu\text{m}\sim 4\ \mu\text{m}$ ，顶端延伸出 $18\ \mu\text{m}$ 长的之字形结构，分生孢子着生在之字形结构上。分生孢子透明，表面光滑，圆柱状常向一侧略弯曲( $3.5\ \mu\text{m}\sim 5.0\ \mu\text{m}$ ) $\times$ ( $1.5\ \mu\text{m}\sim 2.0\ \mu\text{m}$ )。在麦芽或燕麦琼脂培养基上菌落 $2.5\ \text{cm}\sim 4.0\ \text{cm}$ (14 d)，开始表面白色棉絮状，以后变成粉末状；表面起初无色，长期培养变成黄褐色。

### A. 2.5 蠕孢白僵菌 [*Beauveria vermiconia* de Hoog & Rao]

菌丝透明表面光滑，直径 $1.5\ \mu\text{m}\sim 3.5\ \mu\text{m}$ ，常常是二分支。产孢结构(conidial apparatus)紧密成簇，由一群膨大的细胞( $5.0\ \mu\text{m}\sim 60\ \mu\text{m}$ ) $\times$ ( $3.0\ \mu\text{m}\sim 4.0\ \mu\text{m}$ )构成，这些膨大细胞进一步分枝产生较小的膨大细胞或产孢细胞。产孢细胞有一个椭圆或瓶状的基部( $4.0\ \mu\text{m}\sim 5.0\ \mu\text{m}$ ) $\times$ ( $2.0\ \mu\text{m}\sim 2.5\ \mu\text{m}$ )，顶部延伸出一个之字形弯形或镰刀形，外侧 $2.5\ \mu\text{m}$ 内侧 $1.0\ \mu\text{m}\sim 1.5\ \mu\text{m}$ 。

### A. 2.6 缘膜白僵菌 (*Beauveria velata* Sam son & Evans)

菌丝透明有隔，直径 $2.0\ \mu\text{m}\sim 4.0\ \mu\text{m}$ ，淡黄色至浅褐色，孢子形成后表面粉末状，背面起初无色以后变黄色。产孢细胞4个~8个成束着生在成熟的菌丝分支上，基部膨大呈球形 $2.5\ \mu\text{m}\sim 3.0\ \mu\text{m}$ ，顶端延伸出短轴丝。分生孢子透明偶见表面光滑，但常常被具有突起的松散的胶质层包裹，孢子球形或椭圆形 $3.0\ \mu\text{m}\sim 4.0\ \mu\text{m}$ 。

## 附录 B

(规范性附录)

绿僵菌(*Metarhizium*)、白僵菌(*Beauveria*)分子鉴定方法

## B.1 原理

通过真菌 18S rDNA ITS 序列克隆与测序,与基因文库中已有数据比较,作为鉴定真菌的分类归属的重要参考依据。

## B.2 试剂

- B.2.1 液氮。
- B.2.2 DNA 提取试剂盒。
- B.2.3 引物。
- B.2.4 *Taq* 酶。
- B.2.5 dNTP。
- B.2.6 氯化镁( $MgCl_2$ )。
- B.2.7 超纯水。
- B.2.8 石蜡油。
- B.2.9 2%的琼脂糖凝胶(含 EB)。
- B.2.10 PCR Preps DNA Purification System 纯化试剂盒。

## B.3 仪器及用具

- B.3.1 PCR 仪。
- B.3.2 电泳仪。
- B.3.3 凝胶成像系统。
- B.3.4 核酸蛋白分析仪。
- B.3.5 1.5 mL、5 mL 离心管。
- B.3.6 可调移液器:0.1  $\mu$ L~10  $\mu$ L。
- B.3.7 可调移液器:20  $\mu$ L~200  $\mu$ L。
- B.3.8 可调移液器:200  $\mu$ L~1 000  $\mu$ L,吸头若干。

## B.4 方法

## B.4.1 DNA 提取

将绿僵菌属(*Metarhizium*)、白僵菌属(*Beauveria*)孢子分别接种到 1/4 SDA、PDA 液体培养基中,28  $^{\circ}$ C 摇瓶培养 48 h,用四层纱布过滤收集菌丝。将 1 g 真菌菌丝在液氮中研磨成粉末,采用 DNA 提取试剂盒提取真菌 DNA。

## B.4.2 真菌 ITS rDNA 的克隆及测序

## B.4.2.1 用通用引物扩增真菌 ITS 区序列:(Paul, B., 2000)

引物为:ITS1 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3';ITS4 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'。

PCR 反应体系(25  $\mu$ L):2.5  $\mu$ L 10 $\times$  *Taq* 酶缓冲液,dNTP 各 200 mol/L, $MgCl_2$  1.5 mmol/L,引物 50 pmol/L,*Taq* 酶 0.5  $\mu$ L(2.5U),模板 DNA 10 ng~1  $\mu$ g,加灭菌超纯水补足总体积 25  $\mu$ L,加 30  $\mu$ L 石

蜡油覆盖。混匀后置于 PCR 热循环仪。

PCR 扩增条件为:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 3 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。

#### B. 4. 2. 2 PCR 产物回收及测序

扩增产物在 2% 的琼脂糖凝胶电泳 2 h, 切胶后, 用凝胶试剂回收盒纯化 DNA 片段, 采用 ITS1、ITS4 引物进行双向测序。

#### B. 4. 3 登陆 NCBI 网站, 将所得序列以 Blastn 软件在线比对, 确定菌株分类地位

登陆 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 网站, 进入 Blastn 页面在 GenBank 中寻找同源 DNA 序列, 根据序列相似性确定菌株分类地位, 或执行 Distance tree, 根据进化树距离确定菌株分类地位。

附 录 C

(资料性附录)

绿僵菌和白僵菌的培养基配方

C.1 绿僵菌培养基

100 mL 萨氏培养基(1/4 SDA): 蛋白胨 0.25 g、酵母浸提物 0.5 g、蔗糖 1 g、琼脂 1.8 g 蒸馏水 100 mL。

C.2 白僵菌培养基

100 mL 改良 PDA 培养基: 马铃薯 20 g、葡萄糖 2 g、蛋白胨 1 g、琼脂 2 g 蒸馏水适量。

注: 马铃薯切片煮沸 30 min 后双层纱布过滤, 取滤液。

**附录 D**  
(资料性附录)  
**试虫饲养方法**

**D.1 东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* (Mey.) 的饲养方法**

**D.1.1 饲料配制**

将新鲜麦麸 800 g 与酵母粉 200 g 拌匀,保存备用。

**D.1.2 蝗蛹孵化**

将产在装有蛭石的产卵杯(直径×高度=7 cm×10 cm)中的蝗虫卵块,连同产卵杯(盖上盖子)放在 30 ℃ 的恒温箱中 7 d,取出后置于 60 cm×60 cm×45 cm 的饲虫箱中,打开盖子,调节饲虫箱内湿度 65%~75%,温度为 28 ℃±1 ℃。

**D.1.3 蝗蛹饲养**

蝗蛹孵出后,称取 10g 饲料放在直径为 120 mm 的培养皿中,置于饲虫箱中;将饮用水装入带有棉纱布的 100 mL 三角瓶中,放入饲虫箱中。每天换新鲜的饲料与饮用水。调节饲虫箱内湿度 65%~75%,温度为 28 ℃±1 ℃。

**D.1.4 成虫饲养**

蝗蛹羽化为成虫后,每天称取 20 g 饲料放在直径为 120 mm 的培养皿中,置于饲虫箱中;将饮用水稀释 10 倍后,装入带有棉纱布的 100 mL 三角瓶中,放入饲虫箱中。每天换新鲜的饲料与饮用水。并在饲虫箱中放置三个装有直径为 2 mm~3 mm 蛭石的产卵圆筒 7 cm×10 cm。调节饲虫箱内湿度 65%~75%,温度为 28 ℃±1 ℃。

**D.1.5 卵块收集**

将产有卵块的产卵筒取出后,盖上盖子于恒温培养箱 30 ℃±1 ℃ 孵育 6 d 后,放在 4 ℃~10 ℃ 的冰箱保存,备用。

**D.2 铜绿丽金龟 *Anomala Corpulenta* 的饲养方法**

**D.2.1 食料作物**

培养铜绿丽金龟幼虫的作物为发芽的玉米幼根或马铃薯块,成虫的食料作物为玉米叶片。

**D.2.2 幼虫的饲养**

将同一天孵化的幼虫放于小饲养盒(φ8 cm×5 cm)内饲养,盒底放 3 cm~4 cm 厚的潮湿细土(过 830 μm 筛),使土壤含水量保持在 18%~20%。1 龄和 2 龄期幼虫相互残杀能力较弱,但死亡率较高,每个小饲养盒 5 头幼虫,饲喂发芽玉米嫩根和马铃薯块。2 龄时换土一次,每盒 3 头幼虫。3 龄期幼虫由于相互残杀能力强,进行单头饲养,每盒 1 头幼虫。由于食量和排泄量加大,及时地更换土壤和食料。

**D.2.3 蛹的处理**

3 龄幼虫长到一定时期进入预蛹期,幼虫不食不动,当全身变黄,表明腹部的粪便已经排干净,则不再添加食料,待一定时间后化蛹,将蛹放入潮湿细土中。不要经常翻动,每天傍晚观察成虫的出土情况,将出土的成虫放入饲养盒(50 cm×100 cm×20 cm)中饲养。

**D.2.4 成虫的饲养**

室内饲养的成虫放入饲养盒(50 cm×100 cm×20 cm)中,盒底放 12 cm~15 cm 厚的潮湿细土(过 830 μm 筛),使土壤含水量保持在 18%~20%。上面罩 50cm 高的纱网,每盒雌雄各 50 头左右,饲喂新鲜玉米叶片,在温度 26 ℃±1 ℃、光周期 16 h 光照/8 h 黑暗的养虫室中饲养,视取食情况及时更换食料。

#### D.2.5 产卵及卵的孵化

每3 d~5 d检查土壤湿度和成虫产卵的情况;先将成虫取出,放入另一个已经覆有潮湿细土的饲养盒中,然后检查产卵情况。在初产卵期后,每2 d挑卵一次,将卵放在盛有潮湿细土的饲养盒( $\phi 9\text{ cm} \times 6\text{ cm}$ )中,上面再覆盖一层潮湿细土,在 $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中使其孵化。

### D.3 桃蚜 *Myzua persicae* Sulzers 的饲养方法

#### D.3.1 食料作物

培养桃蚜的作物为张开的3叶~4叶去除顶心的甘蓝苗。其培养方法为:将甘蓝种子播种于盛有1:1的地表土和腐殖土的搪瓷盘( $250\text{ mm} \times 150\text{ mm} \times 50\text{ mm}$ )中,置于 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、RH87%、16 h光照的条件下培养,3周后移栽至小钵中继续培养。当甘蓝苗生长至3片~4片叶片时剪去子叶及顶心备用。

#### D.3.2 桃蚜饲养

将20钵植有3片~4片叶去除顶心的甘蓝苗置于 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、RH87%、16 h光照的搪瓷盘( $250\text{ mm} \times 300\text{ mm} \times 50\text{ mm}$ )中,接上桃蚜放于光照培养箱中培养。光照周期16 h光照/8 h黑暗,相对湿度60%~70%。

#### D.3.3 种群延续

从老的植株上剪下有蚜虫的叶片,置于 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、RH87%、16 h光照的搪瓷盘( $250\text{ mm} \times 300\text{ mm} \times 50\text{ mm}$ )中,置于顶心的3片~4片叶的甘蓝苗之间,待叶片失水萎蔫蚜虫便会爬到新植株上。一周后更换老叶。从接蚜算起两周可提供试验用蚜。

### D.4 马尾松毛虫 *Dendrolimus punctatus* 的饲养方法

#### D.4.1 松针的保存和消毒

将野外采集的松针装入塑料袋放于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,需要时每次拿出适量松针用含3%有效氯的漂粉精溶液浸渍消毒5 min~10 min,然后用清水冲洗去药液,在室内阴干备用。

#### D.4.2 幼虫饲养

##### D.4.2.1 马尾松毛虫卵的来源

将采自于松毛虫质型多角体病毒病株上较少的卵,新发生的小龄马尾松毛虫茧放于昆虫饲养网箱( $60\text{ cm} \times 60\text{ cm} \times 45\text{ cm}$ )内,于 $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、RH87%、16 h光照/8 h黑暗条件下,待羽化交尾产卵后采卵即可。

##### D.4.2.2 幼虫的孵化

收集虫卵并用2%福尔马林液消毒5 min,然后用清水冲洗去药液后放于塑料盒( $21\text{ cm} \times 14\text{ cm} \times 3\text{ cm}$ , $28\text{ cm} \times 18\text{ cm} \times 10\text{ cm}$ )内,置于 $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中孵化幼虫。

##### D.4.2.3 幼虫的饲养

因刚孵化的松毛虫有群集习性,每盒可以多收幼虫群体饲养,至3龄~4龄时再分盒饲养。5月~10月可在自然光照和温湿度条件下室内饲养,其余时间 $22\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 29\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,光周期为14 h光照/10 h黑暗条件下饲养。将刚孵化的马尾松毛虫用新鲜的松针饲养于塑料盒内,每天或隔天更换塑料盒1次,用毛笔将松毛虫掸下放入新换的塑料盒中,添上新鲜的松针;换下的盒子用消毒剂消毒,然后用清水冲洗干净晾干备用。收集刚孵化的幼虫、更换松针时动作要轻,以免幼虫受机械损伤死亡。塑料盒饲养湿度大,幼虫易发生真菌病,应及时处理病死幼虫并对用具进行消毒。

##### D.4.2.4 营茧羽化

幼虫老熟后爬到底层松针间吐丝结茧,茧椭圆形。小心取出塑料盒中的茧,放入昆虫饲养网箱中,自然条件下羽化。

#### D.4.3 交尾产卵

松毛虫成虫交尾活动期主要在晚上,天亮时产卵,雌蛾将卵产于网纱上,产卵后几天成虫自然死亡。



## 附录 E

(资料性附录)

## 绿僵菌、白僵菌生物活性测定方法

## E.1 绿僵菌毒力测定

## E.1.1 绿僵菌油悬浮剂的配制

绿僵菌油悬浮剂样品按 5.2.4 方法用血球计数板在显微镜下检查含孢量；再用色拉油稀释成系列浓度梯度，即  $10^9$  个孢子/mL、 $10^8$  个孢子/mL、 $10^7$  个孢子/mL、 $10^6$  个孢子/mL、 $10^5$  个孢子/mL，备用。

绿僵菌孢子粉剂样品按 5.2.4 方法用血球计数板检查含孢量；再用煤油制成孢子悬浮液，并用色拉油稀释成系列浓度梯度，即  $10^9$  个孢子/mL、 $10^8$  个孢子/mL、 $10^7$  个孢子/mL、 $10^6$  个孢子/mL、 $10^5$  个孢子/mL，备用。

## E.1.2 试虫接种

E.1.2.1 东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* 的接种

自室内饲养的东亚飞蝗种群中，挑选体长约 10 mm、1 日龄东亚飞蝗雄成虫，每头分别点滴 5  $\mu$ L 孢子油悬浮液于成虫前胸背板下，每个处理 3 个重复，每个重复各接种 30 头。设置用色拉油做处理的试虫为对照，共做 3 个重复，每个重复各接种 30 头。接种后置于饲养盒中饲养，每天定时观察，更换新鲜麦苗并添加 20 g 人工饲料(麦麸：酵母：麦苗 = 10:10:1)，饲养温度为  $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度为 80%~90%，光周期 16 h 光照/8 h 黑暗。

E.1.2.2 铜绿丽金龟 *Anomala corpulenta* 的接种

准备过 830  $\mu\text{m}$  筛、在  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  下烘干 24 h 的土壤待用。将孢子油悬浮液装入养虫盒(300 mm  $\times$  200 mm  $\times$  120 mm)内。以色拉油空白对照、由不同浓度的药剂配成的孢子油悬浮液，在土壤样中分别加入药液 100 mL，搅拌均匀，并加水达到 50% 湿度。每处理 3 个重复，每个重复各接种 30 头，视取食状况添加发芽玉米嫩根或马铃薯块，在  $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下饲养，每天定时观察。

## E.1.3 结果检查和统计分析

分别统计、计算累计死亡率，按式(E.1)计算校正死亡率。……………(E.1)

式中：

$n_1$ ——处理总死虫数，单位为头；

$n$ ——处理总虫数，单位为头。

累计校正死亡率按式(E.2)计算：

$$W_7 = \frac{m_1 - m_2}{1 - m_2} \times 100 \quad \dots\dots\dots(E.2)$$

式中：

$m_1$ ——处理组累计死亡率，%；

$m_2$ ——对照组累计死亡率，%。

进行统计分析，计算药剂的  $LC_{50}$ 、 $LD_{50}$ 、 $LT_{50}$ 、b 值(标准误)等值及其 95% 置信限。

## E.2 白僵菌毒力测定

## E.2.1 白僵菌油悬浮剂的配制

方法同 E.1.1。

## E. 2.2 试虫接种

### E. 2.2.1 桃蚜 *Myzus persicae* Sulzers 的接种

采用过滤浸渍法接种,即先将生长一致的蚜虫放入有滤纸的布氏漏斗中,用吸管吸取相应的孢子悬浮液,让其迅速流入布氏漏斗中使蚜虫悬于孢子液中,2 s 后迅速抽去多余药液,取出中等活泼的蚜虫放入保湿的培养皿中饲养,每皿处理 10 头,每处理 5 个重复。设置用色拉油做空白处理的试虫为对照。处理后的试虫置于  $20\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  的光照培养箱中饲养(14 h 光照/10 h 黑暗),从第 3 天开始逐日记载死亡的蚜虫头数。

### E. 2.2.2 马尾松毛虫 *Dendrolimus punctatus* 的接种

自室内饲养的马尾松毛虫种群中,挑选体重相同的 3 龄幼虫,每头分别点滴  $1\text{ }\mu\text{L}$  孢子油悬浮液于虫体前胸背板上,每个浓度各做 3 个重复,每个重复各接种 30 头。设置用色拉油做处理的试虫为对照,共做 3 个重复,每个重复 30 头。接种后放回养虫室人工饲养,每天定时观察。

### E. 2.3 结果检查和统计分析

方法同 E. 1. 3。

## 附录 F

(资料性附录)

## 真菌油悬浮剂悬浮率的测定方法

## F.1 方法提要

将样品在  $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴条件下,于具塞量筒中静置 30 min 后,通过测定底部悬浮液与上悬浮液试剂含孢量,计算悬浮率。

## F.2 仪器

F.2.1 烧杯:100 mL、200 mL。

F.2.2 磨口具塞玻璃量筒:250 mL(内径 38.5 mm~40 mm,刻度间距 20.0 cm~21.5 cm,250 mL 刻度线与瓶塞底部间距 4 cm~6 cm)。

F.2.3 水流减压管。

F.2.4 恒温培养箱。

F.2.5 光学显微镜。

F.2.6 血球计数板:XB-K-25。

## F.3 测定步骤

将待测样品倒入 250 mL 具塞量筒中至上线,盖上瓶塞在 1 min 内上下颠倒 30 次,使之充分均匀,立即放入  $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温箱中静止恒温 30 min。轻轻取出并用一接有水流减压管的吸管将瓶中菌液由上液面逐渐向下吸出 225 mL,盛于烧杯中(此为上悬液),控制整个操作过程在 15 s~20 s 内完成。量筒中所剩孢子悬浮液为下悬液。分别混匀上下悬液,按照 5.3.4 方法测定上、下悬液中孢子浓度,计算悬浮率。

## F.4 计算

试样的总悬浮率按式(F.1)计算:

$$W_8 = \frac{111 \times 225 \times c_1}{225 \times c_1 + 25 \times c_2} \dots\dots\dots(F.1)$$

式中:

$c_1$ ——上层悬浮液孢子浓度,单位为个孢子每毫升(个孢子/mL);

$c_2$ ——下层悬浮液孢子浓度,单位为个孢子每毫升(个孢子/mL)。