

不同地理来源球孢白僵菌菌株的生物学特性*

刘兴磊^{1,2}, 王金刚¹, 张正坤², 徐文静², 李启云^{2**}

1. 东北农业大学园艺学院, 哈尔滨 150030; 2. 吉林省农业科学院植物保护研究所, 公主岭 136100

摘要: 采集并分离来源于吉林省 10 个地区的 15 株野生球孢白僵菌菌株, 比较了各菌株孢子萌发率、菌落直径、产孢量、胞外蛋白酶产生水平等指标的差异。试验结果表明, 孢子萌发率高的菌株类型为孢子型, 菌落生长迅速的菌株类型为菌丝型, 产孢量高的菌株类型为混合型。而胞外蛋白酶产生水平与菌落形态特征不具相关性。筛选出菌株 D4-2-1、CHL20 可作为生物防治菌株。

关键词: 球孢白僵菌; 生物学特性; 菌落形态; 胞外蛋白酶产生水平; 相关性

中图分类号: S476.12

文献标识码: A

文章编号: 2011-5684(2011)

DOI:

网络出版地址:

Biological Characteristics and Morphological Characteristics of Different Strains of *Beauveria bassiana*

LIU Xing-lei^{1,2}, WANG Jin-gang¹, ZHANG Zheng-kun², XU Wen-jing², LI Qi-yun²

1. College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Institute of Plant Protection, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100, China

Abstract: Fifteen wild strains of *Beauveria bassiana* were collected and isolated from 10 regions of Jilin Province, compared their spore germination rate, colony diameter and sporulation. The results indicated that high spore germination rate strains were the conidia type, fast growing strains of colony type were the hyphae type, and strains' characters between the conidia type and the hyphae type were the mixed type, respectively. While protease activity test showed that there was no correlation between the extracellular protease production level and colony morphology. In conclusion, the strains of D4-2-1 and CHL20 were potential for biological control.

Key words: *Beauveria bassiana*; biological characteristics; colony morphology; extracellular protease production level; correlation

球孢白僵菌[*Beauveria bassiana* (Ba1s.) Vuill] 是广泛用于生物防治的虫生真菌之一。尽管人们对其生物学特性进行了很多研究, 但许多研究表明, 不同地理来源的菌株不仅具有不同的寄主专化性, 其生物学特性也存在一定差异^[1]。因此在具体实践工作中, 利用这些目的菌株的差异为生产和应用服务, 筛选出性状优良的菌株具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试菌株 在吉林省未施用白僵菌进行玉米螟 (*Ostrinia nubilalis*) 生物防治的不同地区采集玉米螟僵虫, 并分离了 15 株球孢白僵菌菌株 (表 1), 保存于吉林省农业科学院生物农药实验室。

* 基金项目: 吉林省科技支撑计划重点资助项目 (20080249)

作者简介: 刘兴磊, 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物农药。

收稿日期: 2011-02-19 网络出版时间:

** 通讯作者

表1 供试菌株及来源地区
Table1. Original resource of the tested strains

编号 No.	菌株 Strain	来源地区 Region resource	编号 No.	菌株 Strain	来源地区 Region resource
1	S14-X-1	双辽	9	JT1	九台
2	S9-X-1	双辽	10	TH9	通化
3	L2-8	梨树	11	YSH7	榆树
4	T3-2-1	*	12	D1-5	德惠
5	CHL11	长岭	13	D6-2-1	德惠
6	CHL20	长岭	14	L1-1-1	梨树
7	D4-2-1	德惠	15	JH7	蛟河
8	DA3	大安			

注：“*”为吉林省农科院植保所谭云峰研究员赠予

Note: "*"was donated by Prof. Tan of Plant Protection Institute of Jilin Academy of Agriculture Sciences

1.1.2 培养基 萨氏培养基(SDAY): 4%葡萄糖、1%蛋白胨、1%酵母粉及 1.5%~2.0%琼脂、去离子水 1000 mL, 自然 pH 值。液体培养基(SDY)为不添加琼脂的萨氏培养基。

1.2 方法

1.2.1 球孢白僵菌不同菌株的培养 将沙土管原始保存菌株划线接种到 SDAY 培养基上(90 mm 培养皿, 每皿 20 mL 培养基), 整个过程在超净工作台中无菌操作。接种后放入生化培养箱 26℃培养, 每个菌株 5 次重复, 培养 30 d 后观察其菌落形态特征。

1.2.2 孢子萌发率测定 取在 SDAY 培养基上培养 10 d 后的球孢白僵菌菌株, 分别用无菌水(0.01%吐温-80)收集分生孢子制备成 1×10^7 / mL 孢子悬浮液, 接种到 10 mL SDY 培养基中, 26℃摇床恒温振荡培养后, 于 12, 14, 16, 18, 20 h 后镜检(每视野约 100 个分生孢子), 测定孢子萌发率, 每个菌株重复 3 次。

1.2.3 菌落直径生长比较 采用稀释法进行单孢分离测定。用无菌水配制孢子悬浮液, 稀释到一滴孢子悬浮液约有 20~30 个孢子时, 用无菌枪头吸取一滴(10 μL)滴入到灭菌的培养基平板中。每个菌株 3 次重复, 待菌落长到第 10 d 时采用十字交叉法测量并记录菌落直径。

1.2.4 产孢量测定 待菌落长到第 10 d 时, 测量 1 g 孢子粉的产孢量。把 0.1 g 孢子粉放入 100 mL 无菌水(0.01%吐温-80)中, 充分振荡分散后配制成孢子悬浮液, 滴在血球计数板上, 镜检孢子数, 计算测定产孢量。每个菌株计数 3 次。

1.2.5 胞外蛋白酶测定 参照 Bidochka 等人的明胶-琼脂平板分析法^[2]。明胶-琼脂平板含 10g/L 的明胶和 15 g/L 的琼脂。将待测菌株 1×10^8 / mL 浓度的孢子悬浮液 10 μL (0.02%吐温-80) 点接在平板上,

26±1℃培养 5 d 后用 15%的 HgCl₂ 溶于 2 mol/L HCl 中溶液处理平板, 菌落周围即显示出清晰透明的环。产酶量的大小以透明环直径与该环的菌落直径的比率表示。

2 结果与分析

2.1 培养形态特征

在萨氏培养基上, 不同菌株外观形态差异较大, 根据菌落形态和直径大致可以分为 3 种类型(图 1, 表 2)。表 1 中, 1~10 号菌株分别为 S9-X-1、T3-2-1、CHL20、CHL11、JT1、S14-X-1、D4-2-1、TH9、DA3、L2-8, 菌落呈白色略带灰黄色灰白色粉末状, 均匀分布于培养基, 菌丝稀短, 隐约可见一层层同心轮环, 产孢量大, 按林华峰等分类应为孢子型^[3]; 11 号菌株为 JH7, 菌丝长势旺盛, 呈气生状向空间扩展蔓延, 菌落厚实, 呈绒絮状纯白色, 菌丝生长过程中伴有枯黄色代谢水珠, 产孢量极小, 为菌丝型^[3]; 12~15 号菌株为 D6-2-1、YSH7、D1-5、L1-1-1, 菌丝与孢子粉自中心向外一层层相间排列, 形成凹凸不平的菌落, 菌落呈粉红色或白色, 夹有少量淡黄色孢子粉, 有的菌株出现几圈菌丝带, 产孢量较大, 为混合型^[3]。



图1 培养 30 d 的菌落形态特征
Fig.1. Colony morphology characters for 30 days

表 2 不同菌株菌落直径

Table. 2. Colony diameter of different strains

菌株名称 Strain	菌落直径/mm Diameter
JH7	46.7±3.6 ^{Aa}
S9-X-1	45.2±3.8 ^{ABab}
DA3	45.0±3.5 ^{ABab}
JT1	43.2±7.1 ^{ABCabc}
D4-2-1	40.7±2.3 ^{ABCDabcd}
L2-8	39.4±5.6 ^{BCDcde}
CHL20	39.3±2.6 ^{BCDcde}
D1-5	37.5±3.9 ^{CDEde}
S14-X-1	37.3±1.7 ^{CDEde}
T3-2-1	37.3±6.0 ^{CDEde}
TH9	37.2±5.2 ^{CDEde}
CHL11	37.1±1.6 ^{CDEde}
D6-2-1	35.2±5.3 ^{DEef}
L1-1-1	31.3±4.2 ^{Ef}
YSH7	31.3±2.5 ^{Ef}

注：用 DPSV7.05 版软件统计分析，表中大小写字母表示根据 LSD 多重比较极显著水平 ($P < 0.01$) 和显著水平 ($P < 0.05$)。下同

Note: The result was analyzed by DPSV7.05 software system, the level of significance was at 0.01 and 0.05 respectively. The same below

2.2 不同菌株孢子萌发率比较

供试各球孢白僵菌菌株孢子萌发率差异显著 (表 3)，其中最先萌发且萌发率达到 20% 以上的菌株为 S14-X-1、JT1、D4-2-1、CHL11、CHL20、D6-2-1。在 20 h 大部分菌株萌发率已经达到 84% 以上，其中 D4-2-1、D6-2-1、CHL20、S14-X-1、CHL11、YSH7、

L1-1-1 萌发率达到 90% 以上。20 h 菌株 JH7 萌发率为 24%，TH9 萌发率为 16%，萌发率较低。该结果表明，孢子型菌株萌发情况最优，次之为混合型，最差的为菌丝型。

表 3 不同培养时间对菌株孢子萌发率的影响

Table.3 . Spore germination rate of different strains

%

菌株 Strain	培养时间 t/d				
	12h	14h	16h	18h	20h
TH9	0	0	4	11	16
JH7	1	6	9	11	24
S9-X-1	3	10	23	35	50
D1-5	3	27	36	56	86
L2-8	6	13	26	37	51
T3-2-1	6	20	47	64	78
L1-1-1	12	40	54	76	91
DA3	13	23	33	65	84
YSH7	17	25	54	78	92
D6-2-1	20	56	77	85	96
CHL20	29	68	87	91	95
CHL11	34	73	79	88	91
D4-2-1	37	61	74	93	98
JT1	39	64	76	85	86
S14-X-1	39	76	85	88	92

2.3 不同菌株菌落直径、产孢量比较

由表 2 和图 2 分析可知，15 株供试菌株菌落直径、产孢量存在着明显差异。菌株 JH7、S9-X-1、DA3、JT1、D4-2-1 菌落直径 ≥ 40.7 cm，表现出良好的生长

特性；菌株 D4-2-1、T3-2-1、L2-8、YSH7、CHL20 产孢量均在 2.45×10^{10} /mL 以上。菌落生长迅速、菌丝生长特别旺盛的菌株，反而产孢量都不大或者不产孢，分析其原因为营养生长过剩，生殖生长反而衰退

[4]。综合 2 项指标及菌落形态，孢子型菌株菌落生长迅速且产孢量高为最优，菌丝型菌株菌落生长速度最快但产孢量低次之，混合型菌株菌落生长速度慢且产孢量低为最差。

2.4 不同菌株胞外蛋白产酶产生水平比较

表 4 为供试菌株胞外蛋白酶产量。经 Duncan 检验 ($P=0.196$)，各菌株胞外蛋白酶产生水平差异不显著，因此胞外蛋白酶产生水平与菌株类型没有相关性。

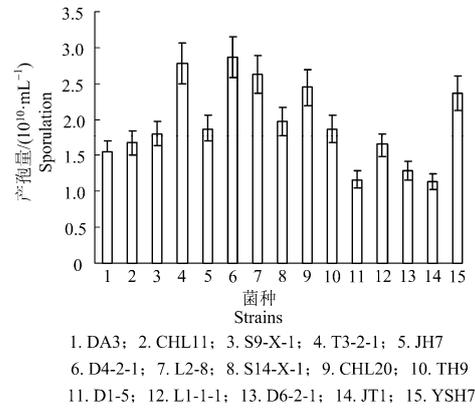


图 2 不同菌株产孢量
Table 2. Sporulation of different strains

表 4 供试菌株在明胶平板上胞外蛋白产酶水平
Fig. 4. Extracellular protease productive level of different strains on gelatin-agar

菌株 Strains	透明环/mm transparent ring	菌落直径/mm Diameter of clony	透明环/菌落直径 Transparent ring/ Diameter
YSH7	24.5~25.0	6.0~7.0	3.70±0.37 ^a
CHL20	22.0~29.5	7.0~7.0	3.57±0.57 ^{ab}
L1-1-1	24.0~26.5	7.0~7.0	3.57±0.19 ^{ab}
T3-2-1	23.5~26.5	7.0~7.0	3.55±0.22 ^{abc}
CHL11	20.5~27.0	7.0~7.0	3.45±0.48 ^{abc}
L2-8	22.0~29.5	6.0~8.0	3.44±0.74 ^{abc}
JH7	23.0~28.0	7.0~8.0	3.40±0.11 ^{abc}
S9-x-1	20.0~24.5	6.0~7.0	3.37±0.11 ^{abc}
D4-2-1	20.5~27.0	7.0~7.0	3.31±0.49 ^{abc}
D1-5	22.0~25.5	7.0~8.0	3.30±0.24 ^{abc}
TH9	21.0~23.5	7.0~7.0	3.17±0.18 ^{abc}
S14-x-1	19.5~22.5	6.0~7.0	3.14±0.32 ^{abc}
JT1	21.0~21.5	7.0~7.0	3.07±0.07 ^{abc}
D6-2-1	20.0~21.5	7.0~7.0	2.98±0.11 ^{bc}
DA3	17.5~22.5	7.0~7.0	2.86±0.36 ^c

3 讨论

野生白僵菌菌株的筛选是优良白僵菌菌株发掘的主要手段，由于野生菌株采集量大，如果进行所有菌株的生物测定，投入的成本大，时间长。有研究表明，不同球孢白僵菌菌株在培养条件相同时，菌株间性状有较大差异，并且与杀虫效果存在相关性，对定向筛选目的菌株具有重要意义^[3]。以菌株培养的菌落形态特征作为白僵菌优良菌株初步筛选的依据，可以节约成本和时间，再对筛选好的菌株进行生物测定，最终筛选到优良的目的菌株。

当以外源蛋白质明胶作为主要碳源和氮源时，球孢白僵菌能合成胞外蛋白酶并分泌到培养基中^[1]。有研究发现该蛋白酶产生水平与菌株的侵染力有密切关系^[5-6]。因此在对吉林省菌株 D4-2-1、CHL20 的生防应用还需进一步探索。

菌株的孢子萌发率、菌落生长速度、产孢量等指标在菌株筛选时并没有统一的标准，胞外蛋白酶产生水平虽然与菌株毒力相关，但是并不能作为评价的唯

一手段，因此筛选菌株时必须综合评价考虑。在具体实践中还应该结合寄主的专化性，选择昆虫做生物测定，得出毒力评价的指标作为依据。

吉林省多年来施用和推广球孢白僵菌进行玉米螟的生物防治取得了良好的效果，本研究从吉林省未使用过白僵菌的地区采集并分离野生菌株，进行生物学特性的分析，发现孢子型白僵菌菌株具有良好的生物学特性，此类菌株与林华锋等的研究结果一致。孢子型菌株产孢量大，对寄主毒性强，具有良好的物理性能，开发应用价值较大^[3]。其中菌株 D4-2-1、CHL20 产孢量高，孢子萌发早，且萌发率高，菌落生长速度较快，胞外蛋白酶产量与其他菌株无明显差异，综合各项指标优于其他菌株，具有较好的应用前景，在今后的工作中将进一步验证其生物学功能，为筛选到优良的白僵菌菌株奠定基础。

参考文献:

[1] 王成树,黄勃,樊美珍,等. 球孢白僵菌数量性状的典型相关分析[J]. 菌物系统,1999,18 (4) :385-391.
[2] Bidochka M J,Khachatourians G G. Purification and properties of an

刘兴磊等: 球孢白僵菌不同菌株生物学特性与其菌落形态特征的相关性分析

- extracellular protease produced by *Beauveria bassiana*[J]. Appl Environ Microbiol. 1987,53:1679-1684.
- [3] 林华峰,李增智,类美珍.白僵菌菌株特征的研究及宣州林区菌株类型的确定[J].安徽农业科学,1996,24:46-52.
- [4] 孙继美,汤坚,丁贵银.球孢白僵菌不同菌株生物学特性的研究[J].安徽农业大学学报,1996,23(3):297-302.
- [5] Kucera M. Protease from the fungus *Metarhizium anisopliae* toxic for *Galleria mellonella* larvae[J]. J Invertebr Pathol, 1980,35:304-310.
- [6] St Leger R L, Durrands PK, Charnley AK. et al. The role of extracellular chymoelastase in virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta* [J]. J Invertebr Pathol, 1988, 52:285-293.