

文章编号:1003-8701(2011)04-0041-04

防治玉米螟高效球孢白僵菌新菌株筛选

徐文静¹,尹唯凰²,张正坤¹,杨敏芝¹,王义生¹,李启云^{1*},梅书泉³

(1. 吉林省农业科学院植物保护研究所,长春 130033;2. 吉林省实验中学,长春 130000;

3. 吉林省农安县高家店农业技术推广站,吉林 农安 130200)

摘要:从吉林省田间采集玉米螟僵虫,进行菌株的分离、纯化,通过对产孢子力、孢子发芽力和玉米螟幼虫毒力进行评价,选育出7株(D1虫-5、D1虫-9、L2虫-8、L1-1-1、D6虫-2、D10虫-2、S9虫-X-1)产孢子力强、气生孢子发芽率高和毒力强的白僵菌新菌株。实验表明:7个菌株固体麦麸发酵产孢量分布在160亿~335亿个孢子/g的固体发酵物;气生孢子培养16h萌发率为48%~93%,22h萌发率均达到100%;孢子浓度10⁶亿个/mL,接种8d时,玉米螟幼虫僵死率在93%~100%;菌株毒力强弱与产孢能力和孢子萌发率无明显相关性,但与孢子浓度和作用时间呈正相关性。

关键词:白僵菌;玉米螟;菌种选育;毒力测定

中图分类号:S435.14

文献标识码:A

Selection of High Efficient *Beauveria bassiana* Strains against *Ostrinia furnacalis*

XU Wen-jing¹, YIN Wei-huang², ZHANG Zheng-kun¹,YANG Min-zhi¹, WANG Yi-sheng¹, LI Qi-yun^{1*}, MEI Shu-quan³

(1. Plant Protection Institute, Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Changchun 130033;

2. Experiment School of Jilin Province, Changchun 130000; 3. GA Ojiadian Agricultural Technology Extension Station of Nongan county, Nongan 130200, China)

Abstract: White worms of *Ostrinia furnacalis* were collected from fields in Jilin Province the isolation and purification of new *Beauveria bassiana* strains were undertaken. 7 strains (D1 worm-5, D1 worm-9, L2 worm-8, L1-1-1, D6 worm-2, D10 worm-2, S9 worm-X-1) were obtained, which showed high sporulation, germination rate and virulence against larva of *Ostrinia furnacalis*. The results illustrated that the sporulation of all 7 strains were between 16-33.5 billions spores/g by solid fermentation, the germination rate of spores were 48%-93% at 16 hours and 100% at 22 hours post cultivation, respectively. The muscardine lethal rate was 93%-100% at a 10.6 billions/ml spores density. The virulence was not correlated to sporulation and germination rate, but positively correlated to spores density and acting time.

Keywords: *Beauveria bassiana*; *Ostrinia furnacalis*; Strains selection; Virulence evaluation

玉米是我国第二大粮食作物,年产1500亿kg,可用来食用,也可以作为饲料和工业原料生产

工业酒精和烧酒等。而亚洲玉米螟(*Ostrinia furnacalis*)是我国玉米生产中的主要害虫,该虫不仅取食玉米叶片、蛀入玉米主茎或果穗内,降低光合作用,影响养分运输,还产生各种次级病害,致使玉米减产降质。常年造成玉米的产量损失在7%~15%,严重年份减产50%以上,甚至绝产,给我国粮食生产造成巨大的经济损失^[1]。

收稿日期:2011-01-21

基金项目:吉林省科技厅重点项目(20080249)

作者简介:徐文静(1977-),女,副研究员,硕士,主要从事白僵菌生物防治研究。

通讯作者:李启云,男,研究员,博士,E-mail:qyli@cjaas.com

白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 是一种丝状真菌, 属半知菌亚门丝孢纲丝孢目丛梗孢科白僵菌属 (*Beauveria*) , 是目前应用最广泛的虫生真菌, 具有致病性强、杀虫范围广、环境友好等优点, 但在防治中仍存在杀虫速度慢、杀虫效率低等缺点, 限制了白僵菌制剂的产业化和推广, 导致目前白僵菌应用主要以政府推广为主^[2-4]。因此, 在玉米螟防治中急需培育产孢力强、孢子发芽率高和对玉米螟毒力强的高致病新菌株。本研究通过在吉林省田间采集玉米螟僵虫, 进行实验室菌株分离、斜面纯化、二级和三级固体发酵培养, 并通过产孢力、孢子发芽率和玉米螟幼虫毒力测定, 最终选育出产孢力强、气生孢子发芽率高、毒力强的 7 株新菌株, 为白僵菌资源的应用开发提供了原材料。

1 材料与方法

1.1 材料

玉米螟幼虫由吉林省农业科学院植物保护研究所鲁新研究员提供。

菌种分离和一级斜面培养均采用改良 PDA 培养基 (200 g 马铃薯, 1.5% 葡萄糖, 0.2% 蛋白胨, 2% 琼脂粉, 定容至 1 L, pH 值自然), 二级发酵采用 SDY 培养液 (1% 蛋白胨, 1% 酵母粉, 3% 葡萄糖, pH 值 7.0), 三级固体发酵采用麦麸 / 稻壳培养基 (麦麸 / 稻壳 = 8/2, 适量加水, 搅拌均匀, 灭菌后震动使其松散)。

1.2 方法

1.2.1 玉米螟僵虫采集方法

2008 年 5 月在吉林省四平市梨树县蔡家、长春市德惠夏家店四青咀、四平市双辽等地采集玉米螟僵虫, 每头僵虫独立分装并标记, 见表 1。

1.2.2 白僵菌菌株分离与选育方法

僵虫分离: 无菌条件下, 0.1% 升汞消毒玉米螟僵虫虫体 3~5 min, 无菌水洗 3 次, 置于 PDA 培养基上, 25℃ 培养 8~10 d, 观察、记录。

单孢分离与纯化: 选择僵虫再生孢子, 制备浓度为 10^3 个孢子 / mL 的孢子悬液, 100 μ L 涂布于 PDA 培养基上, 25℃ 培养 7 d, 观察菌种生长情况;

斜面选育: 选择生长状态好的单孢接种至一级斜面 25℃ 培养 7 d, 观察菌种生长情况。

1.2.3 白僵菌二级发酵含孢量测定方法

选择生长状态好的一级斜面, 制备孢子悬液, 定量接种到 100 mL SDY 培养液中, 25℃ 震荡培养 3 d, 显微镜下计数孢子数量, 计算培养液含孢

量, 每个斜面重复 3 次。

1.2.4 白僵菌三级发酵含孢量测定方法

取 50 mL 二级发酵液接种到定量麦麸 / 稻壳载体上, 混匀, 25℃ 静置培养 20 d, 显微镜下计数孢子数量, 计算培养基含孢量, 每个处理重复 3 次。

1.2.5 白僵菌气生孢子萌发率测定方法

制备浓度为 10^5 个孢子 / mL 的孢子悬液, 取 1 mL 接种到定量 SDY 培养液中, 25℃ 震荡培养 24 h, 显微镜下计数孢子萌发情况, 计算萌发率。

萌发率 = (萌发孢子总数 / 孢子总数) $\times$ 100%

1.2.6 白僵菌孢子对玉米螟幼虫毒力测定方法

制备不同浓度梯度孢子悬液 (稀释成 5×10^4 、 5×10^5 、 5×10^6 个孢子 / mL 菌悬液) 进行毒力测定, 每浓度处理 30 头玉米螟幼虫, 过程是用玉米螟虫体蘸不同浓度孢子悬液 2 秒钟, 然后每头虫子分装饲养, 无菌水为对照, 每天调查死虫 (调查 8 d), 计算死虫率, 每处理重复 3 次。

死虫率 = (死虫头数 / 30) $\times$ 100%

校正死亡率 = [(死虫头数 - 对照死虫头数) / (30 - 对照死虫头数)] $\times$ 100%

僵虫率 = (僵死虫头数 / 30) $\times$ 100%

校正僵死率 = [(僵死虫头数 - 对照僵死虫头数) / (30 - 对照僵死虫头数)] $\times$ 100%

若对照死亡率 < 5%, 无需校正; 对照死亡率在 5%~20% 之间, 应进行校正; 对照死亡率 > 20%, 实验需重做。

2 结果与分析

2.1 僵虫采集情况

吉林省政府在部分地区推广白僵菌、赤眼蜂防治玉米螟, 所以吉林省玉米螟的发生程度有很大差别, 未防治地区发生严重, 采集玉米螟较为容易; 而进行白僵菌防治地区, 玉米螟相对很少, 但僵虫比率较高。为了采集野生白僵菌菌株, 本研究在吉林省未防治地区采集到健康玉米螟 430 头, 僵虫 33 头, 具体情况如表 1。

表 1 采集玉米螟情况

地区	健康玉米螟	玉米螟僵虫	其他死虫	僵虫 / 健康
四平市双辽	30	14	9	0.47
长春市德惠夏家店	362	10	5	0.03
四平市梨树县蔡家	38	9	5	0.24
合计	430	33	19	0.08

2.2 白僵菌菌株分离情况

通过单孢分离和斜面培养, 获得菌落边缘光滑、孢子层厚、孢子层颜色深、菌落中间无次生菌

丝菌株 49 株,同时获得性状极差的菌株 5 株,这些菌株在资源和基础研究方面具有重要的研究意义,可能对白僵菌对玉米螟致病机理阐述,白僵菌关键致病基因挖掘具有一定的意义,有待于进一步深入研究。

2.3 一级斜面菌株选育情况

通过一级斜面培养观察,根据菌落边缘光滑程度、孢子层薄厚、孢子层颜色深浅、菌落中间无次生菌丝等生长状况,从 49 株菌株中筛选出 7 株性状较好的菌株 (D1-5、D1-9、L2-8、L1-1-1、D6-2、D10-2 和 S9-X-1)进行二级液体和三级固体发酵含孢量测定,并选取气生孢子进行玉米螟幼虫毒力和气生孢子发芽率测定。

2.4 白僵菌二级液体发酵情况

按 1 亿个气生孢子 /50 mL 发酵液的接种量在 SDY 培养液中培养 72 h 后,显微镜下统计孢子含量。发现供试菌株产生的孢子在液体发酵情况下,形态不完全是球形,还有卵形和棒状等形态;随着培养时间延长,卵形孢子逐渐减少,球形孢子增多,这可能与球形孢子是一种更适应逆境的繁殖体相关^[7]。孢子计数结果显示,7 株菌株孢

子含量均在 1 亿个孢子 /mL 发酵液以上,随着发酵时间延长还有增多趋势,其中 L2-8 菌株的产孢能力最高,达到 3.16 亿个孢子 /mL 发酵液;D1-5 产孢能力最低,在 1.62 亿个孢子 /mL 发酵液,这两个菌株液态产孢能力相差约一倍(图 1A)。

2.5 白僵菌三级固体发酵情况

50 mL 浓度为 1 亿个孢子 /mL 的二级发酵液接种到 50 g 拌水麸皮和稻壳(麸皮 / 稻壳 =8/2)混合物上保湿发酵培养 20 d,测产孢量。结果表明,D6-2 含孢量为 160 亿个孢子 /g 发酵物(图 1B),产孢率最低;S9-X-1 含孢量为 335 亿个孢子 /g 发酵物,产孢率最高。这两个菌株产孢能力相差约一倍,但均远高于 100 亿个孢子 /g 发酵物,均是产孢能力强的菌种。

2.6 白僵菌气生孢子萌发率情况

孢子悬液 25℃ 培养 16 h,L2-8 孢子萌发率达到 93%,D1-5 的萌发率为 48%(图 1C)。孢子继续萌发,在培养 22 h 后,包括 D1-5 在内的所有菌株萌发率均达到 100%(图 1D),说明获得的 7 株菌株气生孢子活力均很好,这是选择高毒力白僵菌的重要标准之一^[5]。

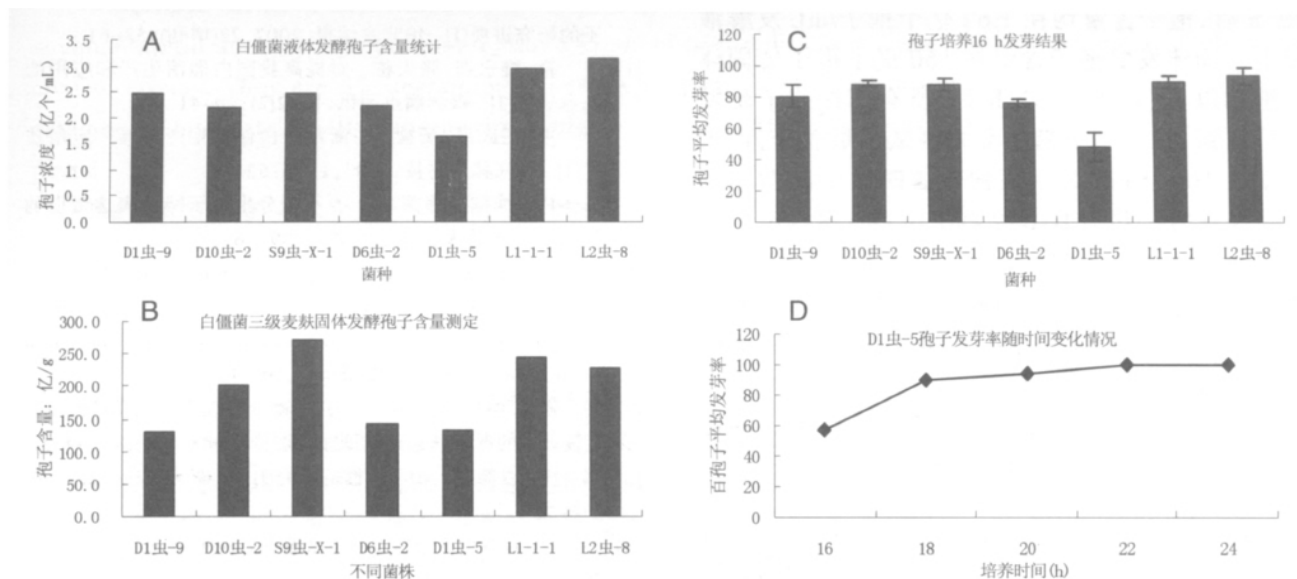


图 1 菌株选育数据

A SDY 液体发酵孢子含量;B 固体发酵物孢子含量;C 16 h 孢子萌发率;D D 虫 1-5 不同时间发芽情况

2.7 玉米螟毒力情况

孢子悬液杀虫毒力研究表明,7 个菌株接种 6 d 后,玉米螟幼虫开始大量僵死,僵死率最高达到 71%,其中 D1 虫-5、D10 虫-2 和 S9 虫-X-1 三株菌株毒力表现突出(图 2A);接种 8 d 时(图 2B),孢子浓度为 10⁶ 个 /mL 时玉米螟僵死率在 93% 以上,最高达到 100%,其中 D1 虫-5、D10 虫-2、L1-1-1 和 S9 虫-X-1 四株菌株毒力更强,这明

显高于刘智辉^[8]报道的 10⁷ 个 /mL 孢子浓度,毒力更高。同时,从图 2 中可以看出,玉米螟僵死率与孢子浓度及接种时间呈正相关,本研究与胡强等^[6]报道的对小麦蚜毒力浓度为 1.1×10⁸ 个孢子 /mL 接种 8 d 致死率达到 93% 相比,本研究获得的菌株的有效浓度更低,致死时间更短,理论上具有更高的毒力,说明本研究获得的白僵菌具有更高的毒力。

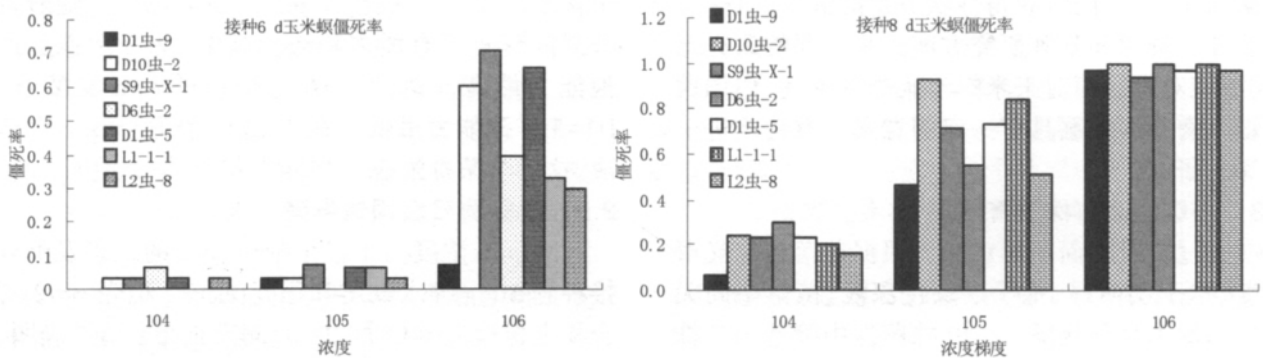


图 2 玉米螟毒力数据

A 6 d 毒力数据; B 8 d 毒力数据

3 结论与展望

3.1 结论

本研究通过菌株分离纯化及选育的一系列试验,获得了大量野生白僵菌新菌株,从其中选择 7 个菌株 (D1 虫-5、D1 虫-9、L2 虫-8、L1-1-1、D6 虫-2-1、D10 虫-2 和 S9 虫-X-1) 进行二级液体发酵、三级固体发酵培养及产孢力、孢子萌发率和玉米螟毒力测定等研究。结果表明:液体发酵培养 72 h 后,孢子含量均在 1.62 亿个孢子/mL 发酵液以上,固体发酵孢子含量在 160 亿个孢子/g 固体发酵物以上,培养到 22 h 后,所有菌株孢子萌发率均达到 100%。玉米螟毒力测试结果表明,孢子浓度在 10^5 个/mL 时,接种 8 d 时 7 个菌株均表现较强毒力,其中 D10-2 和 L1-1-1 菌株僵死率均达到 80% 以上。此外,根据以上研究数据发现,菌株毒力强弱与产孢能力和孢子萌发率无明显相关性,但与孢子浓度和作用时间呈正相关性,值得进一步探讨其相关机理。

综上所述,本研究获得了 7 株高产孢、高毒力,具有推广价值的新菌株。

3.2 展望

随着世界人口膨胀,科技快速发展,地球已经严重超负荷运载,生存环境急剧恶化,正因为如

此,环境友好、对人无害、可增加粮食产量的生物农药白僵菌已经是植物保护学家的重点研究对象。通过自然采集、分离得到了产孢力强、毒力高,优良的白僵菌新资源,具有现实的开发意义,有望开发出生产应用品种,在生产实际中造福人类,推动白僵菌的商业化、规模化生产和应用。

参考文献:

- [1] 陈元生. 我国玉米螟防治技术研究概况 [J]. 杂粮作物, 2001, 21(4): 36-38.
- [2] 陆 晴,董建臻,曹伟平,等. 球孢白僵菌生长及毒力影响因子的研究进展[J]. 华北农学报, 2007, 22(增刊): 58-61.
- [3] 王 森,捷永训,张天栋. 对提高我国白僵菌生产和应用的几点看法[J]. 森林病虫通讯, 1992(2): 40-41.
- [4] 蒋 平,王武昂,汤社平. 浙江省白僵菌生产及推广应用技术[J]. 浙江林业科技, 1993, 13(6): 52-56.
- [5] 张佳诗. 球孢白僵菌 D₁₋₅ 不同分生孢子特异表达蛋白的筛选[D]. 吉林大学硕士论文, 2009: 16-28.
- [6] J. Sun et al. Effects of virulence, sporulation, and temperature on *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* laboratory transmission in *Coptotermes formosanus* [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2003(84): 38-46.
- [7] 胡 强,贝纳新,高 萍,等. 白僵菌 Bb2 菌株生物学特性及对小麦蚜虫的毒力测定[J]. 湖北农业科学, 2008, 47(4): 430-432.
- [8] 邓 庄. 白僵菌生物学特性的研究[J]. 植物学报, 1962, 10(3): 210-229.
- [9] 刘智辉. 球孢白僵菌对亚洲玉米螟毒力检测的研究[D]. 华中农业大学硕士论文, 2005.