

文章编号: 1003-8701(2015)05-0063-05

# 球孢白僵菌粉剂保存条件的研究

徐文静<sup>1</sup>, 王金刚<sup>2</sup>, 武海峰<sup>1,2,3</sup>, 隋丽<sup>1</sup>,  
王娟<sup>1,2</sup>, 张正坤<sup>1</sup>, 张佳诗<sup>1</sup>, 路扬<sup>1</sup>,  
贺薇<sup>1,2</sup>, 李启云<sup>1\*</sup>, 王秋华<sup>1</sup>, 栾丽<sup>1</sup>

(1. 吉林省农业科学院植物保护研究所, 长春 130033; 2. 东北农业大学园艺学院, 哈尔滨 150030; 3. 北京东方园林生态股份有限公司, 北京 100000)

**摘要:** 本试验研究以延长球孢白僵菌粉剂储存条件为目标, 拟从温度和化学因子展开, 对粉剂进行孢子萌发率、玉米螟幼虫毒力和 Pr1 蛋白酶活性三方面检测。结果表明球孢白僵菌粉剂最佳配方是 5 号: 95% 白僵菌高孢粉+2% 麦芽糖+3% 蛋白胨, 最佳储存温度是  $-20^{\circ}\text{C} > 4^{\circ}\text{C} > \text{室温}$ 。麦芽糖和蛋白胨是球孢白僵菌生长的必要营养成分, 对球孢白僵菌孢子具有保护作用。

**关键词:** 球孢白僵菌; 萌发率; 毒力; 酶活性

中图分类号: S182

文献标识码: A

## Research on the Preservation Conditions of Powder Formulation of *Beauveria bassiana*

XU Wen-jing<sup>1</sup>, WANG Jin-gang<sup>2</sup>, WU Hai-feng<sup>1,2,3</sup>, SUI Li<sup>1</sup>, WANG Juan<sup>1,2</sup>, ZHANG Zheng-kun<sup>1</sup>,  
ZHANG Jia-shi<sup>1</sup>, LU Yang<sup>1</sup>, HE Wei<sup>1,2</sup>, LI Qi-yun<sup>1\*</sup>, WANG Qiu-hua<sup>1</sup>, LUAN Li<sup>1</sup>

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

2. College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030;

3. Beijing Oriental Garden Ecological Co., Ltd., Beijing 100000, China)

**Abstract:** This research is aim to prolong the storage time of powder formulation of *Beauveria bassiana*. The impact factors include the temperature and the reagent. The germination rate, the virulence to *Ostrinia furnacalis*. and the activity of Pr1 of conidia in the *Beauveria bassiana* powder formulation were detected. The results showed that the best *Beauveria bassiana* powder formulation was number 5: the 95% higher concentration spores powder of *Beauveria bassiana*. plus 2% maltose and 3% peptone. The optimum storage temperature was  $-20^{\circ}\text{C}$ . The maltose and peptone is the important carbon and nitrogen source to *Beauveria bassiana*, which have the protective function to preserve the spore activity of *Beauveria bassiana*.

**Key words:** *Beauveria bassiana*; Germination rate; Virulence; Enzyme activity

球孢白僵菌(*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,对环境好等优点,但

在防治中仍存在剂型单一、劳动效率低、杀虫速度慢、杀虫效率低等缺点<sup>[1-3]</sup>。球孢白僵菌气生孢子为主要成分的微生物农药已研制出多种剂型并投入使用,常见的制剂有粉剂、颗粒剂、乳油、微胶囊和水乳剂等<sup>[4]</sup>。球孢白僵菌作为一种活体微生物为有效成分的真菌杀虫剂,防治农作物害虫具有保持物种多样性、维持生态平衡、药效持效期长、致病力强、防治效果好等优点<sup>[5]</sup>。目前,球孢白僵菌在我国最成功的推广典范是玉米螟和松毛虫的防治,但均为政府推广,使用最多的是白僵菌粉剂,以春天封玉米垛和飞机喷粉为主;白

收稿日期: 2015-05-07

项目基金: 吉林省科技厅自然科学基金项目(20150101074JC); 吉林省留学人员科技创新创业项目资助经费(090504); 吉林省人才开发资金资助项目(C42260001)

作者简介: 徐文静(1977-),女,副研究员,硕士,研究方向: 生物农药。

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

僵菌颗粒剂也有使用,但劳动效率低,应用有限。一直以来,白僵菌新剂型研制一直是该真菌制剂开发的难题<sup>[6-7]</sup>,主要原因是:一、白僵菌孢子是活体的微生物,在研制剂型中白僵菌孢子很容易失活,导致研究出的新剂型药效不高,没有推广的价值;二、即使开发出高效的粉剂,剂型保存和田间应用方法的难度很大也限制了推广使用。

因此,本研究拟在保证球孢白僵菌孢子发芽率、毒力和关键酶活性的前提下,研发出适于储存和高效施用新型粉剂,这将对推动球孢白僵菌制剂大面积应用,提升其在防治玉米螟中的关键地位,为玉米安全生产提供有效的支撑。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

供试菌株:球孢白僵菌 D1-5,由吉林省农业科学院植物保护研究所生物农药实验室筛选、保存和生产,高孢粉含水量在 5%~10%,含孢量  $1 \times 10^{11}$  个/g,萌发率  $\geq 90\%$ 。

供试玉米螟幼虫:三龄,由吉林省农业科学院植物保护研究所汪洋洲博士提供。

### 1.2 球孢白僵菌粉剂制备及保存

球孢白僵菌粉剂配方如表 1。

表 1 粉剂配方

编号	白僵菌孢子粉	2% 蛋白脲	3% 麦芽糖	5% 滑石粉
1	+			
2	+	+		
3	+		+	
4	+			+
5	+	+	+	
6	+	+	+	+

### 1.3 白僵菌粉剂质量检测

#### 1.3.1 孢子粉萌发率测定方法

参照白僵菌生产企业标准<sup>[8]</sup>,将 0.1 g 菌粉放入 100 mL 浓度为 0.05% 的吐温-80 溶液中打散、混匀(镜检下没有密集成块的孢子)。将打散的菌液稀释至  $5 \times 10^7$  个/mL,取 1 mL 加入 9 mL 灭菌的 SDY 液体培养基中,26℃ 恒温振荡培养 20 h 后进行镜检,每个样品重复 3 次,取其平均值。

萌发率 = 已萌发孢子 / (已萌发孢子 + 未萌发孢子)  $\times 100\%$

#### 1.3.2 玉米螟幼虫毒力测定方法

参照 Feng(冯明光)等的方法<sup>[9]</sup>,将试验幼虫在  $1 \times 10^7$  个/mL 的孢子悬液中浸渍 5~10 s 后,放

入事先放好饲料的 24 孔板中,每孔 1 虫,清水浸渍为对照。每个处理重复 3 次,每次重复 24 头。处理 2 d 后,开始每天观察和统计死虫数量,连续观察 8 d。

僵死率 = 处理僵虫 / (处理虫数 - 对照僵虫)  $\times 100\%$

#### 1.3.3 Pr1 蛋白酶活性测定

参照刘兴磊等的方法<sup>[10]</sup>,接种  $5 \times 10^7$  个/mL 分生孢子到 SDY 培养基中,26℃、180 rpm 摇床培养 72 h 得菌丝,无菌水洗涤干净后,将一定湿重的菌丝转入蝉蜕诱导培养基,26℃、180 rpm 摇床培养 24 h,过滤去除菌体得到酶液。酶反应程序是用 sigma 专一显色底物 (Suc-Ala-Ala-Pro-pPhe-PNA) 溶于 (DMSO) 600  $\mu$ L 中,加入 600  $\mu$ L 酶液,50 Mm Tris-HCl,28℃ 保温 10 min,冰预冷的冰乙酸终止反应。反应体系中 DMSO 代替转移显色底物为空白对照,405 nm 处的吸光值即为酶活性。

### 1.4 粉剂贮存

将制备好的球孢白僵菌粉剂分别放置在 4℃、常温、-20℃ 下贮存,每隔 30 d 检测粉剂中孢子的萌发率,每隔 3 个月检测粉剂的玉米螟幼虫毒力和 Pr1 蛋白酶活性,连续检测一年。

### 1.5 数据处理

对萌发率、毒力、酶活性数据进行分析,所有数据分析均用 DPS 数据处理系统软件完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同保存温度对粉剂孢子萌发率的影响

制备的球孢白僵菌粉剂分别在室温、4℃、-20℃ 下避光保存,其孢子萌发率在 12 个月中的变化情况见图 1、图 2、图 3,粉剂孢子萌发率随保存时间延长逐渐降低,但在不同的保存条件下降低的情况又有不同。室温下储存 180 d 时,孢子萌发率均在 67.2% 以上,随着储存时间的延长,萌发率开始急剧下降,至 270 d 时降低到 10.6%~20.9% 之间,之后趋于稳定,储存 360 d 时活孢率由大到小排序为 5 号 > 4 号 > 6 号 > 2 号 > 3 号 > 1 号;4℃ 下储存的粉剂孢子萌发率变化幅度明显小于室温条件,无显著降低的时间段,在储存 180 d 时,萌发率基本都在 68.3% 左右,在储存 360 d 时萌发率最低降至 52.2%,远大于室温下的萌发率,因此可推断,4℃ 比室温更适宜孢子粉的储存,储存 360 d 时活孢率由大到小的排序为 5 号 > 6 号 > 4 号 > 1 号 > 2 号 > 3 号;-20℃ 储存时,孢子萌发率下降速度更慢,在 180 d 时,萌发率均在 71.4% 以上,在 360 d 时萌发率在

41.9%以上,储存360 d时活孢率由大到小的排序为5号>6号>1号>2号>3号>4号,4号粉剂出现与室温和4℃截然不同的情况,萌发率降低非常快。

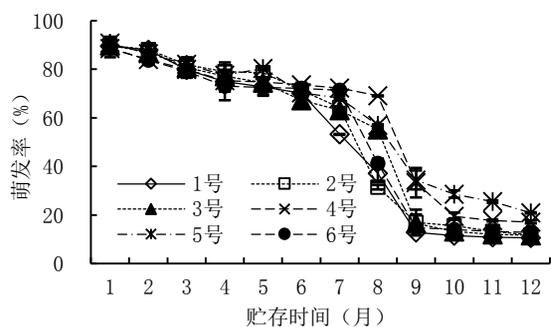


图1 球孢白僵菌粉剂室温储存期间孢子萌发率的变化

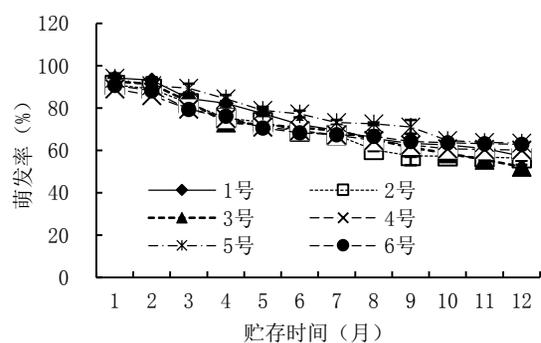


图2 球孢白僵菌粉剂4℃储存期间孢子萌发率的变化

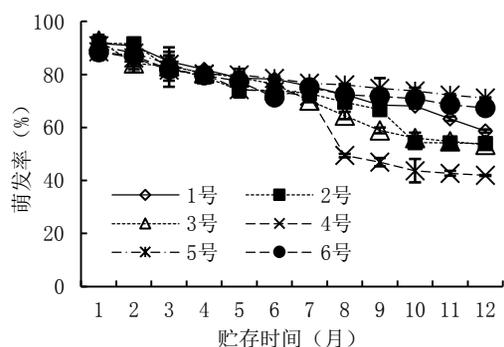


图3 球孢白僵菌粉剂-20℃储存期间孢子萌发率的变化

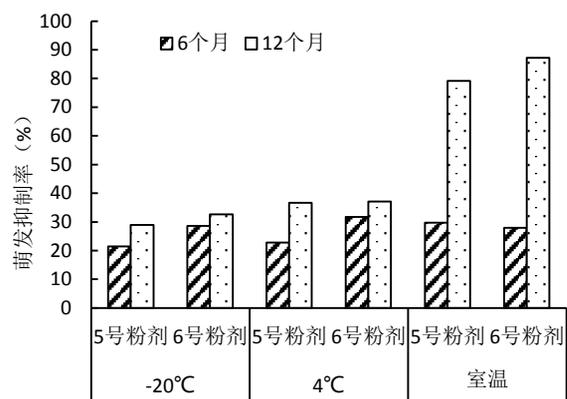


图4 球孢白僵菌粉剂孢子萌发率随时间和温度的变化幅度

图4是粉剂中表现稳定的5号和6号在室温、4℃和-20℃三种情况下的萌发率随时间变化趋势,显示低温更利于粉剂的长期保存,室温不利于粉剂的长期保存,有利孢子萌发的储存条件排序是-20℃>4℃>室温。

### 2.2 粉剂对玉米螟幼虫毒力的影响

球孢白僵菌粉剂对玉米螟幼虫室内生物测定结果(表2、表3、表4)显示,粉剂均对玉米螟幼虫

表2 球孢白僵菌在室温下对玉米螟幼虫的毒力结果

编号	处理时间(d)				
	0	90	180	270	360
1号僵死率(%)	69.7	36.2	33.3	34.78	6.9
2号僵死率(%)	70.2	44.9	40.2	20.29	8.3
3号僵死率(%)	69.9	40.6	40.3	23.19	9.7
4号僵死率(%)	70.1	49.3	37.7	23.19	11.1
5号僵死率(%)	71.1	50.7	40.6	31.88	13.9
6号僵死率(%)	72.1	52.2	27.53	18.8	12.5

表3 球孢白僵菌在4℃下对玉米螟幼虫的毒力结果

编号	处理时间(d)				
	0	90	180	270	360
1号僵死率(%)	69.2	43.5	34.78	30.6	19.4
2号僵死率(%)	70.3	50.7	39.13	31.9	13.9
3号僵死率(%)	71.3	43.5	43.48	36.1	20.8
4号僵死率(%)	72.1	43.4	40.58	37.5	30.6
5号僵死率(%)	73.2	47.82	43.1	34.7	25.0
6号僵死率(%)	72.1	40.6	37.68	33.3	29.1

表4 球孢白僵菌在-20℃下对玉米螟幼虫的毒力结果

编号	处理时间(d)				
	0	90	180	270	360
1号僵死率(%)	69.7	42.1	33.3	30.3	29.2
2号僵死率(%)	68.7	40.6	39.13	36.2	31.9
3号僵死率(%)	72.1	43.5	44.93	34.8	30.6
4号僵死率(%)	73.2	43.5	36.23	29.1	27.8
5号僵死率(%)	70.9	44.9	43.48	39.1	38.9
6号僵死率(%)	73.7	49.3	49.27	43.5	37.5

具有致病性,且同一储存条件下随储存时间延长致病力明显下降,但不同的储存条件下的下降程度并不明显。粉剂在室温下贮存360 d,玉米螟幼虫僵死率在6.9%~13.9%,僵死率大小顺序为5号>6号>4号>3号>2号>1号;在4℃时贮存360 d,僵死率在13.9%~30.6%,大小顺序为4号>5号>6号>3号>1号>2号;在-20℃时贮存360 d,僵死率在29.2%~38.9%,大

小顺序为5号>6号>3号>2号>1号>4号。其中5号和6号粉剂的僵死率明显好于其他粉剂,4号粉剂在4℃时僵死率最高,-20℃时致病力降低异常显著。

### 2.3 粉剂 Pr1 蛋白酶活性的变化

Pr1 蛋白酶是球孢白僵菌表达的一个关键酶,可以降解昆虫的体壁,与昆虫毒性紧密相关<sup>[11]</sup>,从

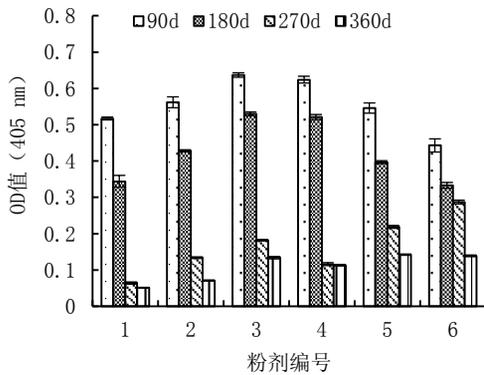


图5 球孢白僵菌粉剂在室温下 Pr1 蛋白酶活性

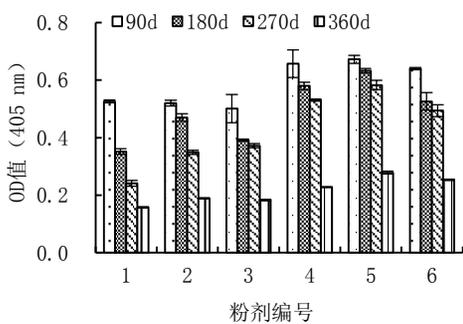


图6 球孢白僵菌粉剂在4℃下 Pr1 蛋白酶活性

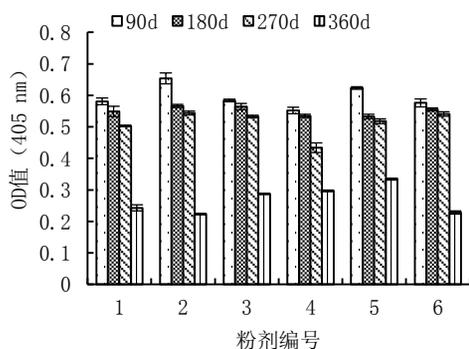


图7 球孢白僵菌粉剂在-20℃下 Pr1 蛋白酶活性

图5、图6、图7可以看出,Pr1 蛋白酶随保存时间延长活力明显降低,但在不同的储存条件下酶活力降低趋势并不相同。在室温储存时,酶活力在180~270 d之间降低显著,但5号和6号粉剂降低幅度相对较小,储存360 d时酶活力大小顺序为5

号>6号>3号>4号>2号>1号;在4℃储存时,酶活力在270~360 d之间降低显著,储存360 d时的酶活力大小顺序为5号>6号>4号>2号>3号>1号;在-20℃下储存时,仍是270~360 d之间降低显著,储存360 d时酶活力大小顺序为5号>4号>3号>1号>6号>2号。

## 3 讨论

球孢白僵菌制剂中主要的活性成分是气生孢子,气生孢子靠接触昆虫体壁,吸附在昆虫体壁上萌发而发挥浸染作用,进而杀死昆虫<sup>[11,11]</sup>。因而粉剂中的活孢子数量是粉剂的有效成分,在研制剂中应在保证活孢子数量的前提下评价制剂的品质。本研究通过麦芽糖、蛋白胨和滑石粉三种化学物质与高孢粉混合后,在室温、4℃和-20℃条件下储存一年,检测孢子萌发率、玉米螟幼虫毒力和 Pr1 蛋白酶活力,发现不同的粉剂都更适宜低温保存,-20℃比4℃保存时间更长;粉剂室温储存时在180~270 d时,孢子发芽率、玉米螟幼虫毒力和酶活力都开始显著下降,到270 d左右,降低速度开始减缓;而-20℃和4℃保存的粉剂,在270~360 d时,孢子发芽率、玉米螟幼虫毒力和酶活力开始显著下降;粉剂储存一年时,5号在孢子萌发率、玉米螟幼虫毒力和酶活力三方面的表现比较稳定,有8组数据处在第一的位置,一组数据处在4号后面,说明麦芽糖和蛋白胨两种化学物质与高孢粉混合后,对孢子活力具有保护作用;粉剂储存一年时,活力数据显示6号明显不如5号,但大部分好于1号,说明滑石粉的加入不利于粉剂活性的保持,但由于麦芽糖和蛋白胨对粉剂具有一定的保护作用,所以粉剂6号的活力好于1号对照;粉剂储存一年时,4号粉剂的数据不稳定,表现差异极大,4℃幼虫毒力排第一,-20℃幼虫毒力和萌发率排倒数第一,这可能与蛋白胨的吸湿性强有关,也可能是实验操作中的不当,改变了粉剂的含水量,最终导致活性数据差异较大,需要进一步研究分析异常的具体原因。

球孢白僵菌气生孢子对湿度非常敏感<sup>[12-14]</sup>,在湿度大于95%时,适宜萌发和浸染昆虫;但湿度过大,却不利于粉剂储存,当湿度大于15%时,室温时储存8个月孢子将完全失活。所以,粉剂储存中需严控含水量在5%~10%之间,尽量低温,方能更长时间的保持粉剂中孢子的活力;此外,球孢白僵菌对除草剂敏感<sup>[15]</sup>,长期保存时应避免接触除草剂。

## 参考文献:

- [ 1 ] 杨敏芝,谭云峰,田志来.不同温、湿度和光照对白僵菌孢子活力的影响[J].吉林农业科学,2005,30(3):60-61.
- [ 2 ] 陶淑霞,李 玉,刘家富,等.球孢白僵菌对亚洲玉米螟幼虫血细胞数量和孢囊作用的影响[J].植物保护学报,2011,38(6):527-531.
- [ 3 ] 魏灵燕.不同白僵菌菌株的生物学特性比较及HFW-05菌株田间种群动态[D].保定:河北农业大学,2012.
- [ 4 ] 汤 坚,黄长春,丁 珊,等.球孢白僵菌剂载体的筛选[J].安徽农业大学学报,1996(3):351-354.
- [ 5 ] 田 甜.飞蝗优良绿僵菌、白僵菌菌株的筛选及应用性研究[D].保定:河北农业大学,2009.
- [ 6 ] 刘 健,陈洪章,李佐虎.白僵菌杀虫剂生产工艺研究状况与展望[J].中国生物防治,2003,19(2):86-90.
- [ 7 ] 朱昌雄,丁振华,蒋细良,等.微生物农药剂型研究发展趋势[J].现代化工,2003,23(3):4-8.
- [ 8 ] 殷凤鸣,潘务耀,李增智.白僵菌生产企业标准[J].安徽农业大学学报,1996(23):321-325.
- [ 9 ] Feng M G, T J Poprawski. Robustness of the time-dose-

mortality model in bioassay data analysis of microbial control agents and chemical agents for insect control[J]. Subtropical Plant Science, 1999(51): 36-38.

- [ 10 ] 刘兴磊.球孢白僵菌的生物学特性及对蚜虫的致病力研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2011.
- [ 11 ] 彭国雄,张永军,杨星勇,等.球孢白僵菌不同世代菌株胞外蛋白酶与毒力的关系[J].中国生物防治,2000,16(2):61-64.
- [ 12 ] 程国华,舒 静,丁克坚.球孢白僵菌营养需求及培养条件研究[J].中国农学通报,2006(5):365-368.
- [ 13 ] 张 航,崔 阳,董晓宇,等.球孢白僵菌孢子的耐逆性研究[J].哈尔滨师范大学自然科学学报,2014,30(5):104-107.
- [ 14 ] 应盛华,冯明光.真空干燥球孢白僵菌纯孢粉的活孢率、毒力与贮存期[J].微生物学通报,2002,29(5):42-47.
- [ 15 ] 王义生,朱晓敏,张荣宝,等.5种除草剂对白僵菌孢子萌发的影响[J].吉林农业科学,2015,40(2):62-63,91.

(责任编辑:王 昱)

(上接第36页)

本试验旨在探索提高马铃薯产量与肥料密度互作的效应,为马铃薯产业提质增效健康发展提供技术支撑。结果表明:试验所代表的地区种植马铃薯要获得高产,不但要选择增产潜力高的高产品种,还要适当注意播种密度和施肥量间关系;选择最佳的施肥量和播种密度是农民获得最大效益的唯一捷径。

本试验中B3处理增产效果不明显,可能与气候因素有关。另外,选择密度不太合理,筛选出的种植密度最佳阈值20~30 cm过大。今后在20~30 cm间细化种植密度,以期缩小阈值寻找最佳拐点,为农民测土施肥及合理密植提供理论依据。为吉薯1号不同密度和不同施肥量配套栽培技术奠定理论基础。

## 参考文献:

- [ 1 ] 陈光玉,文云书,刘 辉,等.不同播种密度对脱毒马铃薯费乌瑞它产量的影响[J].贵州农业科学,2008,36(6):55-56.
- [ 2 ] 黑龙江农业科学院马铃薯研究所,中国马铃薯栽培学[M].北京:中国农业出版社,1994.
- [ 3 ] 陈伊里,王凤义,吕方河,等.马铃薯高产栽培技术[M].哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1997.
- [ 4 ] 王克雄,王效瑜,吴林科.宁夏南部丘陵区马铃薯密度、肥料丰产栽培实验[J].内蒙古农业科学,2009(2):39-40.
- [ 5 ] 王 凤,刘 峰,管洪波,等.吉林省中部地区马铃薯中棚种植试验[J].中国马铃薯,2013,27(2):76-79.
- [ 6 ] 刘 峰,王 凤,王 超,等.保罗微生物酵素菌肥在马铃薯上的应用效果[J].中国农业科学,2011,36(4):31-32.

(责任编辑:范杰英)

## 《中国种业》征订启事

《中国种业》是由农业部主管,中国农业科学院作物科学研究所和中国种子协会共同主办的全国性、专业性、技术性种业科技期刊。

刊物目标定位:以行业导刊的面目出现,并做到权威性、真实性和及时性。覆盖行业范围:大田作物、蔬菜、花卉、林木、果树、草坪、牧草、特种种植、种子机械等,信息量大,技术实用。

读者对象:各级种子管理、经营企业的领导和技术人员,各级农业科研、推广部门人员,大中专农业院校师生,农村专业户和广大农业生产经营者。

月刊,大16开,每期8元,全年96元。国内统一刊号:CN 11-4413/S,国际标准刊号:ISSN 1671-895X,全国各地邮局均可订阅,亦可直接汇款至编辑部订阅,挂号需每期另加3元。

邮发代号:82-132 地 址:(100081)北京市中关村南大街12号 中国种业编辑部

电 话:010-82105796(编辑部) 010-82105795(广告发行部) 传 真:010-82105796

网址:www.chinaseedqks.cn E-mail: chinaseedqks@caas.cn chinaseedqks@163.com