

不同环境条件对球孢白僵菌 HFW-05 的敏感性变化

宋 健,曹伟平,陆 晴,杜立新

(河北省农林科学院 植物保护研究所,河北省农业有害生物综合防治工程技术研究中心,河北 保定 071000)

摘要: 通过对温度和紫外线等条件的变化,明确了该因素对 HFW-05 菌株生长与毒力的影响。结果表明,25℃ 培养有利于提高孢子萌发率及菌株产孢量;30℃ 培养有利于提高菌株产酶量,最适菌株生长的温度范围是 25~30℃。生测试验表明,HFW-05 菌株对小菜蛾的最佳致死温度范围为 25~30℃。菌株在 25℃ 下经紫外线 1 h 处理后,萌发率可比对照增加 12%,产孢量增加 26%,表明适量紫外处理有利于菌株生长。

关键词: 球孢白僵菌;环境;胞外蛋白酶活性;毒力

中图分类号:S476.12 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2012)增刊-0363-05

Sensitivity to Changes of Environmental Factors on *Beauveria bassiana* HFW-05 Strain

SONG Jian, CAO Wei-ping, LU Qing, DU Li-xin

(Institute of Plant Protection, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences,
IPM Centre of Hebei Province, Baoding 071000, China)

Abstract: To explore sensitivity changes of HFW-05 strain treated by different temperature and ultraviolet irradiation, the growth and toxicity of the strain under different temperature and UV radiation was studied. Results indicated that germination and sporulation of the strain was appropriate at 25℃, and the enzyme production could increase at 30℃. The growth rate and sporulation were increased at 35℃ with UV radiation under 1 h, but the growth rate would reduce with postponement of the exposure time. The lethal rate of the *Plutella xylostella* (Linnaeus) was 93.1% by the treatment of 30℃, and it could effectively control the population of insect.

Key words: *Beauveria bassiana*; Environment; Activity of extracellular protease; Toxicity

球孢白僵菌能够寄生多种昆虫,但不同菌株对寄主有一定的专化性,致病力也有一定的差异。在环境中,球孢白僵菌活性成份的稳定性会直接影响到对害虫的防治效果,同时寄生虫态以及外界环境条件等因素也对致病力有影响^[1]。温度、湿度是影响菌株致病力的 2 个最重要的环境因素^[2-3],另一个重要影响因素是紫外光对孢子的杀伤作用^[4]。由于太阳辐射源的多变性和不稳定性,人工模拟紫外照射成为人们研究虫生真菌抗紫外能力等的主要途径。本试验选择对小菜蛾(*Plutella xylostella* (Linnaeus))具有高致病力的菌株 HFW-05,研究在不同温度及紫外条件对菌株生长和对小菜蛾幼虫致病力的变化,分析温度变化对菌株生长产酶和毒力的

影响,及不同温度下紫外光照射对菌株生长的变化。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 球孢白僵菌 HFW-05 菌株^[5]。

1.1.2 供试昆虫 小菜蛾由本实验室室内人工饲养,选取健康适龄幼虫用于试验测定。

1.1.3 供试培养基 SDY: 葡萄糖 40 g,蛋白胨 10 g,酵母浸粉 10 g,蒸馏水 1 000 mL,自然 pH; SDAY: 葡萄糖 40 g,蛋白胨 10 g,酵母浸粉 10 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL,自然 pH。

1.2 试验方法

1.2.1 温度条件对菌株萌发率的影响 将孢子悬

收稿日期:2012-07-29

基金项目:河北省财政项目(F12C10034);国家“948”项目(2011-G4);国家“863”项目(2011AA10A201)

作者简介:宋 健(1980-),女,河北涿州人,助理研究员,硕士,主要从事杀虫微生物研究。

通讯作者:杜立新(1978-),男,河北武安人,助理研究员,博士,主要从事生物防治研究。

浮液接种于萨氏培养基中,置于人工培养箱中不同温度(15 20 25 30 35℃)下培养,在液体培养基中接种浓度为 1×10^6 孢子/mL的孢悬液,(25 ± 1)℃振荡培养(170 r/min)。各处理于16 h镜检,每次镜检5个视野,不少于500个孢子,每处理设5次重复,统计孢子萌发率。

1.2.2 温度条件对菌株产孢量的影响 在固体培养基上接种浓度为 1×10^7 孢子/mL的孢悬液200 μ L,用灭菌玻璃涂棒涂布均匀,(25 ± 1)℃培养4 d。待孢子成熟后,使用直径8 mm打孔器在菌苔上均匀打孔,放入装有玻璃珠的10 mL无菌水(含0.05% OP乳化剂)三角瓶中,170 r/min振荡使孢子分散均匀,使用血球计数板于相差显微镜下计数,计算平均产孢量,每处理设5次重复。

1.2.3 温度条件对菌株胞外蛋白酶的影响 HFW-05菌株胞外蛋白酶通过摇床振荡培养获得。250 mL三角瓶装入液体培养基100 mL,接种1 mL孢悬液(1×10^8 孢子/mL),(26 ± 1)℃下振荡(170 r/min)培养3 d,4℃离心,取上清液于-20℃保存。采用Folin酚法测定胞外蛋白酶^[6],以每分钟催化分解蛋白质生成1 μ g酪氨酸的酶量为一个酶活性单位(μ g/(min·mL))。测定并记录不同碳氮源对该菌株胞外蛋白酶的影响,每处理5次重复。

1.2.4 对小菜蛾进行毒力测定 采用喷雾法。将大小一致的小菜蛾2龄活泼幼虫放入9 cm培养皿中,分别置于喷雾塔中处理(喷雾量:1.5 mL/皿,压力:151 b/in²,沉降时间:30 s),将处理后的试虫挑入底部有双层湿滤纸的灭菌养虫盒中,并添入新鲜甘蓝叶片,用保鲜膜将盒口封好,在薄膜上扎小孔通气,(25 ± 1)℃、14L:10D光照培养箱中培养24 h内保持90%以上的相对湿度。每日检查死亡虫数,以毛笔轻触试虫体表5 s内完全不动者即为死亡。每处理20头,设4次重复,设无菌水(含0.05% OP乳化剂)对照,对照自然死亡率在5%内且无僵虫视为有效试验。

1.2.5 紫外线照射对菌株生长的影响测定 将孢子悬浮液分置于数个直径9 cm培养皿中,分别于紫外灯(培养皿与灯管短波(UV-C):中心波长254 nm,25 cm距离下紫外线强度500 μ W/cm²)下、不同试验温度(15~35℃)照射不同时间,后将孢子悬浮液浓度调至 1×10^8 孢子/mL备用。

将处理后的菌悬液在25℃萨氏培养液中培养,萌发率、产孢量及酶活测定方法同上。每处理设5次重复,采用未经紫外处理的菌液进行对照。

1.2.6 数据分析 根据观察数据计算校正死亡率。

校正死亡率/% = ((处理死亡率 - 对照死亡率) / (1 - 对照死亡率)) × 100

各处理的死亡率经方差分析,确定处理间在不同时间段的差异。试验所有数据分析均采用DPS数据处理系统软件完成^[7]。

2 结果与分析

2.1 温度条件对HFW-05菌株生长的影响

试验结果(图1)显示,HFW-05菌株在20~30℃中培养6 h后已有大量孢子萌发,未萌发的孢子也已膨大至原孢子体积的约3~4倍大小,在24 h的萌发率均接近100%,试验发现孢子萌发出的芽管生长粗壮,菌丝长势良好;而孢子在15、35℃中萌发较为缓慢,培养6~12 h后仅见少量孢子萌发,其余未萌发孢子膨大不明显,同时在孢子萌发后,芽管生长缓慢,形态短小纤细。由此表明,适宜孢子萌发的温度为20~30℃,过低过高的温度均不利于孢子萌发。

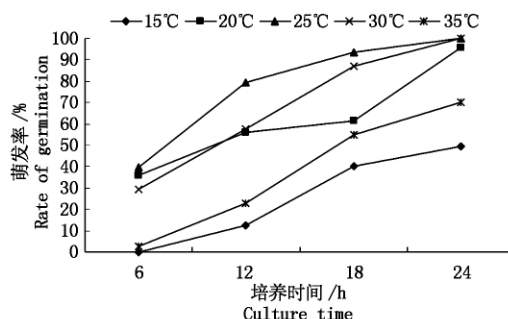


图1 不同温度处理对HFW-05菌株萌发率的影响

Fig.1 Conidial germination of HFW-05 under different temperature conditions

不同温度处理的菌株,其产孢量和产酶量均有所差异。在15~25℃范围内,菌株的产孢量会随温度的升高而增加,在25℃时产孢量达到最高。15~30℃范围内,产酶量随温度升高而增加,菌株在30℃产酶量最大,为125.65 μ g/(min·mL),35℃的产酶量有所下降。综合两项指标可见,在15~25℃

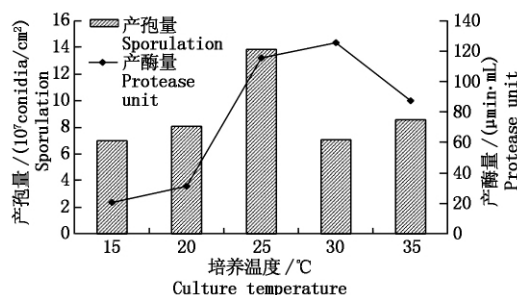


图2 不同温度处理对HFW-05菌株产孢量及产酶量的影响

Fig.2 The sporulation and extracellular protease activity of HFW-05 under different temperature conditions

温度范围内,菌株的产孢量与产酶量呈正相关。

2.2 温度条件对 HFW-05 菌株毒力的影响

在 5 种温度下测定 HFW-05 菌株对小菜蛾的杀虫活性(表 1)。在 25、30℃ 下,菌株均表现出较强的毒力且有一定差异。25℃ 时,菌株对小菜蛾 2~6 d 的校正死亡率由 18.9% 逐步上升至 60%、87.8%;菌株在 30℃ 条件下对小菜蛾 2~6 d 的校正死亡率由 30.7% 上升至 58.5%、93.1%,可能由于 30℃ 时室内生物测定的小环境下湿度较大,孢子更易附着在昆虫体表,可快速穿透表皮造成昆虫死亡。而在 15℃ 时,菌株对小菜蛾的校正死亡率上升缓慢,6 d 的死亡率仅为 29.2%,说明在低温条件下白僵菌的毒效发挥缓慢。结合菌株在 25℃ 下产孢量最大、30℃ 下产酶量最高等特点,表明菌株在适宜生长的温度条件下防治目标害虫可达到良好效果。

表 1 HFW-05 菌株在不同温度下对小菜蛾幼虫的毒力

Tab.1 Effects of HFW-05 strain on larvae of *Plutella xylostella* (L.) under different temperature conditions

温度/(℃) Temperature	校正死亡率/% Corrected mortality		
	2 d	4 d	6 d
15	3.4c	17.9c	29.2c
20	29.6a	45.6b	60.5b
25	18.9b	60.0a	87.8a
30	30.7a	58.5a	93.1a
35	25.7ab	51.0b	61.2b

注:表中数据经 Duncan 氏新复极差检验,同一列数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。表 2 同。

Note: Table entries followed by different lower-case letters in each column were different at the significance level of $P < 0.05$ base on Duncan's new multiple range test. The same as Tab. 2.

2.3 紫外线照射对 HFW-05 菌株生长的影响

HFW-05 菌株孢悬液经不同温度、不同时间的紫外光处理后,置于 25℃ 下培养,观察其生长情况。数据表明,不同紫外线处理下孢子的萌发率均有差别(表 2)。

经 15、35℃ 紫外照射后,菌株的萌发率普遍降到 4% 以下,表明紫外光会严重抑制孢子萌发。20~30℃ 的紫外处理也使菌株萌发率均低于对照,呈显著差异,并且随着紫外处理时间的延长,萌发率均呈下降趋势。但数据显示,25~35℃ 范围内,紫外照射 1 h 的菌株萌发率会有所回升,萌发率最高可达 92.9%,特别是在 25℃ 经紫外处理 10 h 后的萌发率还能保持在 42% 以上,表明菌株在适合生长的温度范围内抗紫外光的能力较强,而过高过低的温度对白僵菌生长不利。

经不同温度、不同时间的紫外处理后的白僵菌产孢量(表 3)。数据显示,除 35℃ 外,紫外照射 1 h 后的

产孢量均高于对照,最高达到 17.46×10^7 孢子/cm²,随着照射时间的延长产孢量稍有下降。在 30℃ 时进行 0.5~6 h 的紫外光照射有助于菌株的产孢,产孢量最高可达 7.74×10^7 孢子/cm²。由此可见,HFW-05 菌株在高温下对试验紫外强度的适应性较好。

表 2 不同紫外处理对 HFW-05 菌株萌发率的影响

Tab.2 Conidial germination of HFW-05 exposed to ultraviolet radiation under different temperature conditions

紫外处理时间/h Exposure time	萌发率/% Rate of germination				
	15℃	20℃	25℃	30℃	35℃
CK	58.3a	85.9a	81.4b	62.8a	53.9a
0.5	12.1b	70.4b	76.1bc	58.3b	0.1f
1	3.7c	54.8c	92.9a	60.2b	3.9b
2	3.2cd	38.4d	79.3b	48.3c	1.1d
4	4.0c	32.1d	74.7c	32.8d	0.9d
6	2.4d	36.9d	77.1bc	22.8e	0.5e
8	2.1d	9.0e	49.6d	21.1e	1.7c
10	0.5e	10.1e	42.5e	8.9f	0.6e

表 3 不同温度下、不同时间紫外处理对 HFW-05 菌株产孢量的影响

Tab.3 Conidia production of HFW-05 exposed to ultraviolet radiation under different temperature conditions

紫外处理时间/h Exposure time	产孢量/($\times 10^7$ 孢子/cm ²) Sporulation				
	15℃	20℃	25℃	30℃	35℃
CK	6.97b	6.66b	13.83b	7.06b	8.55a
0.5	2.83ef	6.89b	9.09c	7.74a	4.04d
1	7.99a	9.67a	17.46a	7.43ab	2.52e
2	6.47b	6.77b	11.98bc	7.43ab	5.54cd
4	6.16bc	4.46d	9.92c	6.52bc	7.53b
6	5.41c	4.01de	6.96de	6.97b	6.22c
8	4.35d	5.88c	7.62d	4.68d	1.77fg
10	2.18f	2.12e	8.31cd	2.84e	1.21g

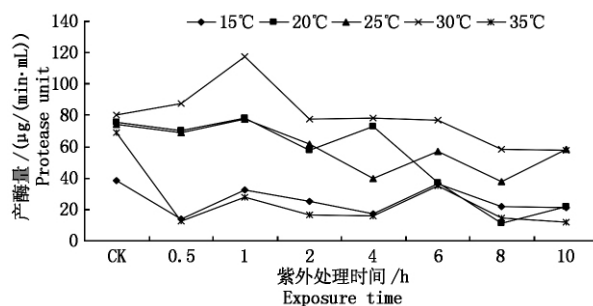


图 3 萨氏培养液中不同紫外处理的 HFW-05 菌株产酶量的变化

Fig.3 The extracellular protease activity of HFW-05 exposed to ultraviolet radiation in SDAY

不同紫外处理的菌株在萨氏培养液中产酶量变化(图 3)。菌株在 30℃ 的产酶量优于其他处理,经紫外光处理 1 h 后的产酶量达到最高,为 117.43

$\mu\text{g}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ 2 h 后产酶量逐渐趋于平稳,照射 8 h 后产酶量又呈下降趋势。经紫外光于 15、35℃ 处理的酶活变化趋于一致,但产酶量均低于同一温度下对照的产酶量,表明在此温度下经紫外照射后对酶活有抑制作用。结果表明,HFW-05 菌株经紫外处理 1 h 后,产酶量均有提升,特别在 30℃ 下经紫外 1 h 处理有利于菌株产酶活性的提高。

3 结论与讨论

球孢白僵菌是一种广谱性的昆虫病原真菌,在防治农林害虫上具有显著的应用潜力。在田间应用时,多种环境条件影响着菌株的正常萌发生长,其抗逆性的强弱同时影响到对害虫的侵染能力。

温度影响菌株的各个生长阶段。研究发现,孢子萌发及菌丝生长的适宜温度范围在 20 ~ 32℃ 之间^[8]。菌株在低温 10 ~ 15℃ 下也适于形成分生孢子,只是孢子萌发时间有所推迟,但萌发率不受影响^[9]。在 26℃ 条件下,各项生物学指标均会达到最高^[10]。很多作物害虫发生在夏季高温季节,田间日间温度经常维持在 35℃ 左右,严重超过球孢白僵菌侵染害虫的适温范围,如果温度高于 32℃,多数白僵菌孢子不能萌发^[1],同时会因菌丝生长过慢,进一步影响到菌株的性状稳定,使菌剂的活性及应用效果受到限制^[11-15]。本试验结果表明,在 30℃ 条件下对 HFW-05 菌株进行 2 ~ 4 h 紫外处理后,菌株萌发及产孢的变化不大,而菌株在 15、35℃ 培养中的萌发较为缓慢,芽管生长缓慢,形态纤细变短,表明温度过低过高不利于菌株萌发。同时菌株的来源、培养环境及选用的培养基不同,生长及耐热性也会有所差别^[16]。少量耐热性强的菌株可适应田间高温环境,也能延长菌株的常温贮存寿命。有研究采用孢子热胁迫反应方法,对球孢白僵菌进行耐热力比较,筛选出一株耐高温(35℃)白僵菌菌株^[17],为在高温下应用提供了可靠保障^[18]。试验表明,15 ~ 25℃ 范围内,菌株的产孢量会随着温度的升高而增加,25℃ 的菌株产孢量达到最高;15 ~ 30℃ 范围内,产酶量也会随温度升高而增加。进一步表明在适宜温度条件下,白僵菌菌株的产孢量与产酶量呈正相关。

有关紫外照射对白僵菌生长影响的报道较少。有学者认为,经 302 nm 紫外光处理 20 min 后,孢子几乎停止发育^[19]。280 nm 的紫外光对白僵菌孢子杀伤力最大^[20]。本试验采用 254 nm 紫外光处理菌株,在外界温度为 25℃、紫外光照射 1 h 后的萌发率可达到 92.9%,高于对照的 81.4%,呈显著差异,表

明菌株在适合生长的温度范围(25℃)内抗紫外光(254 nm)的能力较强。有研究表明,紫外光对细胞的杀伤作用主要是造成 DNA 分子结构的损伤,特别是胸腺嘧啶二聚体的形成,造成 DNA 复制受阻,导致细胞死亡^[21-22]。为减少过量紫外线对菌株生长造成的危害,选择在塑料大棚中使用白僵菌,或者避开强光直射,在光线稍弱、湿度较高的清晨施药,都可以达到提高孢子萌发、增强菌株活性的效果^[23]。

参考文献:

- [1] 邝灼彬,吕利华,冯夏,等. 温度及常见农药对球孢白僵菌生物学特性的影响[J]. 华南农业大学学报, 2005, 26(3): 26-29.
- [2] He Y R, Lu L H, Kuang Z B, et al. Effect of temperature and humidity on the virulence of beetle-derived *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycetes: Moniliales) against the daikon leaf beetle, *Phaedon brassicae*-*Baly* (Coleoptera: Chrysomelidae) [J]. Acta Entomologica Sinica 2005, 48(5): 679-686.
- [3] Zimmermann G. Effects of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae* [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1982, 40: 36-40.
- [4] Morley D J, Moore D, Prior C. Screening of *Metarhizium* and *Beauveria* spp. conidia with exposure to simulated sunlight and a range of temperatures [J]. Mycology Research, 1996, 100(1): 31-38.
- [5] 曹伟平,王金耀,冯书亮. 球孢白僵菌 HFW-05 的诱变筛选及其对烟粉虱若虫的毒力测定[J]. 中国生物防治, 2007, 23(2): 133-137.
- [6] Lowry O H, Rosbrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with folin phenol reagent [J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193: 265-275.
- [7] 唐启义,冯明光. 实用统计分析及其计算机平台[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997.
- [8] Iskandarov U S, Guzalova A G, Davranov K D. Effects of nutrient medium composition and temperature on the germination of conidia and the entomopathogenic activity of the fungi [J]. Prikl Biokhim Mikrobiol, 2006, 42(1): 81-85.
- [9] 武觀文. 微生物杀虫剂的应用. 陈昌洁主编. 松毛虫综合管理[M]//北京: 中国林业出版社, 1990: 256-273.
- [10] 蒲蛰龙. 昆虫病理学[M]. 广州: 广东科技出版社, 1994: 346-350.
- [11] 农向群,高松,邓春生. 白僵菌绿僵菌分生孢子对高温的耐受力[J]. 中国生物防治, 1999, 15(3): 111-114.
- [12] 王成树,王四宝,樊美珍. 球孢白僵菌菌株耐热力与贮藏稳定性的关系[J]. 中国生物防治, 1999, 15

- (4): 162 – 165.
- [13] 王成树, 樊美珍, 李增智. 时间 – 温度、时间 – 湿度对球孢白僵菌孢子的互作效应 [J]. 应用生态学报, 1999, 10(4): 475 – 477.
- [14] 孙鲁娟, 吴孔明, 郭予元. 不同温、湿度下白僵菌对棉铃虫幼虫的致病力 [J]. 昆虫学报, 2001, 44(4): 501 – 506.
- [15] McClarchie G V, Moore D. Effect of temperature on the viability of the conidia of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations [J]. Mycology Research, 1994, 98: 749 – 756.
- [16] Wraight S P, Jackson M A, de Kock S L. Production, stabilization and formulation of fungal biological agents. In: Butt T, Jackson C, Magan N. ed. Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential [M]. London: CAB International, 2001: 253 – 287.
- [17] Ying S H, Feng M G. Relationship between thermotolerance and hydrophobin-like proteins in aerial conidia of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* as fungal biocontrol agents [J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 97: 323 – 331.
- [18] 俞 佳, 冯明光. 基于分生孢子热胁迫反应的球孢白僵菌耐热菌株筛选 [J]. 菌物学报, 2006, 25(2): 278 – 283.
- [19] Edgington S, Segura H, Dela Rosa W, et al. Photoprotection of *Beauveria bassiana*: testing simple formulations for control of the coffee berry borer [J]. International Journal of Pest Management, 2000, 46: 169 – 176.
- [20] 黄长春, 汤 坚, 王成树. 紫外辐射对球孢白僵菌的影响及适宜保护剂的选择 [J]. 安徽农业大学学报, 1996, 23(3): 346 – 350.
- [21] eltine W. Ultraviolet light repair and mutagenesis revisited [J]. Cell, 1983, 33: 13 – 17.
- [22] Sutherland B M. Photoreactivating enzymes [J]. The Enzymes, 1981, 14: 481 – 515.
- [23] Costa H S, Robb K L, Wilen C A. Increased persistence of *Beauveria bassiana* spore viability under high ultraviolet-blocking greenhouse plastic [J]. Hort Science, 2001, 36(6): 1082 – 1084.