

布氏白僵菌微菌核的诱导培养及条件优化

杨欣 张大敏 李增智*

安徽农业大学省微生物防治重点实验室 安徽 合肥 230036

摘要: 菌核是一些丝状菌的休眠结构, 具有很强的抗逆性和稳定性。近年来发现有些虫生真菌在特定的营养条件下能形成微菌核 (MS)。以适用于地下害虫防治的布氏白僵菌为对象, 研究观察了该菌摇瓶培养微菌核形成的过程, 通过单因子实验和部分因子实验确定培养液的碳源 A、碳氮比 B 和接种量 C 为影响 MS 产量的显著因子, 而装液量和转速是不显著因子; 通过最陡爬坡实验和中心组合实验得出 MS 摇瓶培养参数的最优二次多项式回归模型, 确定在 A=30.66g/L, B=7.59:1, C=1.03%时, MS 产量理论最大值为最高 (8.24×10^3 MS/mL), MS 实验产量在 $8.00-8.25 \times 10^3$ MS/mL, 优化的结果产量比初始试验时的最大值提高 21%–25%。研究结果为探索使用布氏白僵菌菌核防治地下害虫奠定了基础。

关键词: 微菌核, 布氏白僵菌, 碳源, 碳氮比, 接种量

Induction and culture condition optimization of *Beauveria brongniartii* for microsclerotial production

YANG Xin ZHANG Da-Min LI Zeng-Zhi*

Provincial Key Laboratory of Microbial Control, Agricultural University of Anhui, Hefei, Anhui 230036, China

Abstract: Sclerotium is a dormant structure of some hyphomycetes with high resistance ability and stability in soil. In recent years, it was found that microsclerotia (MS) of some entomopathogenic fungi formed under special culture conditions. *Beauveria brongniartii* is an important entomopathogenic fungus mainly for soil pest control. In the present study, formation of MS by *B. brongniartii* in shake culture was observed, and the indices of carbon source (A), carbon-nitrogen ratio (B) and inocula amount (C) were determined to be significantly important factors, while the initial inoculation volume and rotation speed were not important. By a steepest ascent design and a central composite design, an optimal culture model was determined, which resulted in a maximum MS production of 8.24×10^3 MS/mL, while A=30.66g/L, B=7.59:1 and C=1.03%. A optimization test resulted in a MS production of $8.00-8.25 \times 10^3$ MS/mL, 21%–25% higher than the maximum yield produced in the initial test. The data of this study will benefit the potential application of *B. brongniartii* MS for soil pest control in the future.

Key words: microsclerotium, *Beauveria brongniartii*, carbon source, carbon-nitrogen ratio, inoculum volume

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30972368)

*Corresponding author. E-mail: zzli@ahau.edu.cn

收稿日期: 2013-04-13, 接受日期: 2013-05-17

布氏白僵菌 *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch 是一种重要的昆虫病原真菌, 国内外常用于防治蛴螬等 (Zimmermann 2007; 苏品等 2009)。由于土壤是昆虫病原真菌的良好生境, 故该菌在蛴螬的防治方面具有较好的应用潜力。该菌可以水悬浮液形式喷施土壤, 但颗粒剂应用更为有效和实用: 以颗粒为中心产生大量分生孢子, 敏感性地下害虫在土壤中爬行时只需碰到 1 或几个颗粒即可感病 (Jaronski & Jackson 2008)。连续几年施用该菌可使土壤中带菌量逐年增加, 造成昆虫自然流行病, 起到长期控制的作用 (邓春生等 1995)。

关于布氏白僵菌的研究多集中在分生孢子和菌丝的液体深层培养方面 (林华峰等 2006)。国内尚无用它研制的杀虫剂产品登记, 国外已有瑞士、奥地利、意大利、日本、留尼汪岛和哥伦比亚等国的 7 种产品 (Faria & Wraight 2007) 登记, 而未登记的产品数量远超此数, 涉及到颗粒剂、粉剂、可湿性粉剂和油悬浮剂等剂型。剂型的有效成分包括分生孢子和菌丝, 它们对不良环境的耐受能力有限, 货架期短, 因此需要寻找一种抗性强、寿命长的繁殖体来开发新产品。

Jaronski & Jackson 2008 年首次报道通过液体培养生产出金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 的微菌核 (microsclerotia, 以下简称 MS) 并获美国专利 (Jackson & Jaronski 2010), 在田间防治试验中, 甜菜根蛆 *Tetanops myopaeformis* 一周死亡率即达 100%, 极显著超过田间防治常用的金龟子绿僵菌分生孢子包衣的沙粒。菌核是由菌丝紧密连接交织而形成的黑化、紧实的休眠体, 其大小不一, 形态多样, 是许多丝状真菌生活史中的一种重要的、常见的结

构。其功能主要是抵御干旱的不良环境, 是许多植物病原真菌在土壤中或腐烂的植物组织中的越冬结构; 当环境适宜时, 能萌发产生新的营养菌丝或从上面形成新的繁殖体。例如, 大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae* 的菌核在休眠状态下可以存活达 30 年之久 (Fravel & Tjamos 1995); 在同样高温 (>50°C) 条件下, 该菌的菌丝体和分生孢子均无法生长, 但菌核仍保持生长活力 (黄奔立等 2004)。这种特化结构的抗逆性和稳定性恰恰是普通生防制剂中菌丝体和分生孢子所不具备的, 从而使得 MS 对于土壤害虫的应用潜力有着诱人的研究前景。关于 MS 的生长环境、培养条件 (白应文等 2011) 以及调控机制 (Manuel *et al.* 2005; Amyotte *et al.* 2008) 都有较详尽的报道, 但多集中在植物病原真菌, 尤其是用于防治杂草的真菌。Jackson & Schisler (1995) 在大豆炭疽病菌 *Colletotrichum truncatum* 的深层发酵中得到 200–600 μm 大小的 MS, Connik *et al.* (1997) 和 Boyette *et al.* (2007) 研制了以高岭土颗粒包埋法制备大豆炭疽病菌 MS 制剂, 用于进行杂草田菁 *Sesbania exaltata* 生物防治的研究。最近, Dunlap *et al.* (2011) 还针对温度对大豆褐红坏死病病菌 *Mycocleptodiscus terrestris* 菌核产量的影响进行探讨, 确定产菌核的适宜温度为 22–26°C。王海鸿等 (2011) 完成国内首例球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* MS 的诱导培养, 重点研究了氮源和吐温-80 对 MS 形成的影响, 并证明用 MS 预混到土壤中使得西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* 土栖阶段的死亡率能够显著提高到 81.1%–92.2%。接着, 殷幼平等 (2012) 也诱导获得莱氏野村菌 *Nomuraea rileyi* 的 MS, 对斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 14d

的致死率可达 78.56%。

然而,国内外以往的研究集中在液体诱导培养基的成分和碳氮比对 MS 产量的影响以及杀虫效果,但影响液体培养的因子很多,不研究它们便不能客观地优化培养条件。鉴于迄今国内外尚无这一研究,本文旨在评价有关培养条件后设计最优工艺来诱导 MS 产量的稳定、高产,并通过 MS 的干燥处理评估其抗旱及耐储藏能力。

1 材料与方 法

1.1 菌株与培养基

1.1.1 供试菌株: 布氏白僵菌 *Beauveria brongniartii* Bbr17 菌株,分离自安徽合肥,寄主为一种蛴螬,由安徽农业大学微生物防治省重点实验室提供。

1.1.2 培养基: SDAY 固体培养基。

1.1.3 摇瓶培养液: 基础盐、微量元素和复合维生素 B 参见王海鸿等(2011)的报道;黄豆粉(氮源);葡萄糖(碳源)。培养基的碳氮源用量及碳氮比配方见表 1-4 的实验设计,最终 pH 调至 6.8,10⁵Pa 灭菌 20min 备用。葡萄糖中碳含量按 40%,黄豆粉中氮含量按 6.052%计算。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化: 将冷冻贮藏的 10%甘油水液接种到 SDAY 平板上,在 25℃下培养 14d 后,无菌地将孢子刮至含有 0.05%吐温-80 的无菌水中,打散混匀、稀释,制成终浓度为 1.0×10⁶/mL 的孢子悬浮液备用。

1.2.2 培养: 在 250mL 烧杯中,装入 100mL 培养液,按 0.5%接种量接入孢子悬浮液,置恒温摇床 25℃,150r/min 条件下培养。培养期间每隔 8h 检查,以培养液将挂壁菌丝冲下。每日显微取样观察培养液中生成物的形态。第 6 天时停止发酵,

参照王海鸿等(2011)的处理方法,检测生物量累积,孢子浓度和 MS 浓度。并对培养液生成物用 Calcoflour White (Fluka) 染色,在荧光显微镜下镜检。每个处理设 3 个重复(下同)。

1.2.3 发酵条件的优化: 按照以下程序逐步优化发酵条件。1) 单因子实验: 初筛出影响因素的参考范围。固定发酵培养液的其他成分不变,分别替换其中的碳源浓度、碳氮比、对 MS 数量、孢子产量及生物量积累进行测定。各项指标取平均值,采用单一变量方差分析,最小显著差测验。使用 DPS 软件,One Way 方差分析,Duncan 新复极差检验。2) 部分因子实验: 在单因子实验基础上,进一步对碳源浓度、碳氮比、接种量、摇床转速、装液量等条件进行筛选,确定影响 MS 产量的显著因子。3) 最陡爬坡实验: 根据部分因子实验筛选出的显著因子,以实验值变化梯度为爬坡方向(吕国英等 2010),确定响应面的中心点,逼近 MS 产量最高的区域。4) 中心组合实验: 根据 Box-Behnken 的中心组合实验设计原理(郝学财等 2006),进一步进行 3 因素 3 水平的响应面分析实验,得出 MS 产量的最优条件。2)、4) 实验结果用 Design-Expert 8.05 软件进行分析。

1.2.4 培养液中 MS、孢子产量和生物量累积检测: 1) MS 浓度和芽生孢子浓度检测: 检验方法参见王海鸿等(2011)的报道; 2) 累积生物量检测: 培养 6d 后培养烧杯中取 5mL 培养液,真空过滤到预称重的滤纸上,具体处理方法参见殷幼平等(2012)的报道。

1.2.5 MS 的收集和干燥及复水后菌丝和孢子检测: 摇瓶培养 6d 后向培养液中加入硅藻土(diatomite,以下简称 DE)使浓度达到 5g DE/100mL 培养液。循环水真空泵将 MS、芽生

表 1 在不同营养条件下 Bbr17 菌株 MS 和芽生孢子产量、生物量以及复水后 MS-DE 的复苏率和分生孢子产量

Table 1 Production of microsclerotia (MS) and blastospores, biomass, reviving rate of rehydrated MS-diatomite (MS-DE, similarly hereinafter) and conidium production of Bbr17 isolate of *Beauveria brongniartii* in various liquid culture of different media

碳源浓度 Carbon concentration (g/L)	碳氮比 (C:N)	MS 产量 Microsclerotium production (10 ² MS/mL)	芽生孢子产量 10 ⁵ blastospores/mL MS-DE	生物量 Biomass (g/L)	MS 复苏率 MS reviving rate in MS-DE (%)	分生孢子产量 10 ⁷ conidia/g dried MS-DE
8	20:1	9.67±0.29g	14.50±1.00f	6.45±0.40gh	100a	58.45±5.19f
8	15:1	10.00±0.92g	19.42±1.32ef	5.54±0.82h	100a	61.50±2.38d
8	10:1	13.67±0.85fg	23.67±1.12ef	5.25±0.18h	99.50±0.50abc	67.10±8.96d
8	5:1	19.12±0.28de	30.38±1.01ef	6.71±0.15g	96.97±0.53abc	73.26±10.97c
16	20:1	11.17±0.29fg	47.00±2.17e	11.15±0.88f	96.00±0.81bcd	60.28±7.07e
16	15:1	13.08±0.32fg	28.83±0.56ef	13.41±0.57e	94.06±1.86cd	95.40±10.27ab
16	10:1	14.82±0.92ef	223.33±18.52c	18.45±1.20d	95.05±2.05bcd	113.64±11.32ab
16	5:1	48.00±0.14b	103.75±11.17d	19.17±1.52c	94.07±1.04cd	114.73±4.24ab
32	20:1	25.50±0.08d	270.83±13.76b	19.65±0.71b	93.22±1.70d	70.95±9.69c
32	15:1	33.17±1.84c	210.00±14.66c	21.53±0.30b	92.38±1.20d	85.10±4.71b
32	10:1	66.00±0.98a	109.17±16.67d	22.60±0.47a	92.92±0.58d	190.47±0.47a
32	5:1	41.67±1.16c	313.33±21.95a	21.11±0.57c	91.15±0.99d	167.40±0.47ab

注: 同行不同字母表示在 0.05 水平差异显著 ($P<0.05$)。下表同。

Note: Figures of different letters in the same row indicate significant difference, with $\alpha=0.05$. The same as below.

孢子和 DE 混合物抽滤到滤纸上。从滤纸上分离下来后冷冻干燥, 用卤素水分测定仪 (Halogen Moisture Analyzer) 测试其含水量, 至含水量 <5%, 将混合物捣碎成粉末 (简称 MS-DE), 用封口机包装于铝箔袋中, 4℃下冷藏 (王海鸿等 2011)。储存 4 个月后, 取 25mg 颗粒加入含 5mL 0.5%吐温-80 的无菌水中, 涂布接种至 2%水琼脂培养基上 (殷幼平等 2012)。

2 结果与分析

2.1 布氏白僵菌 MS 生长模式

在以葡萄糖 20g/L, 碳氮比 5:1 的摇瓶培养液中, 接入的分生孢子在 24h 内萌发, 形成匀质

的菌丝; 48h 后菌丝密度增加; 72h 后菌丝开始聚集, 逐渐形成 MS; 120–144h 边缘光滑的 MS 形成(图 1)。成熟后直径多在 200–800 μ m 之间, 平均 (590±35) μ m。

2.2 碳氮比对 Bbr17 菌株 MS 和芽生孢子产量以及累积生物量的影响

葡萄糖添加量为 20g/L、40g/L、80g/L, 碳氮比分别为 20:1、15:1、10:1、5:1。摇瓶培养 6d, 检测发酵液中 MS 数量、孢子产量和累积生物量。摇瓶培养 6d, 检测发酵液中 MS 数量、孢子产量和累积生物量。从表 1 的结果可以看出生物累积量取决于碳氮源含量和碳氮比, 在低碳浓度时, 低碳氮比更有利于产生大量 MS

以及芽孢，并累积生物量；而高碳浓度显然更加有利于 MS 和芽生孢子的形成和生物量的累积；其中以 10:1 的碳氮比时 MS 和生物量的产

量均显著 ($P<0.05$) 高于其他处理，而在 5:1 的碳氮比时芽生孢子的产量显著高于其他处理。

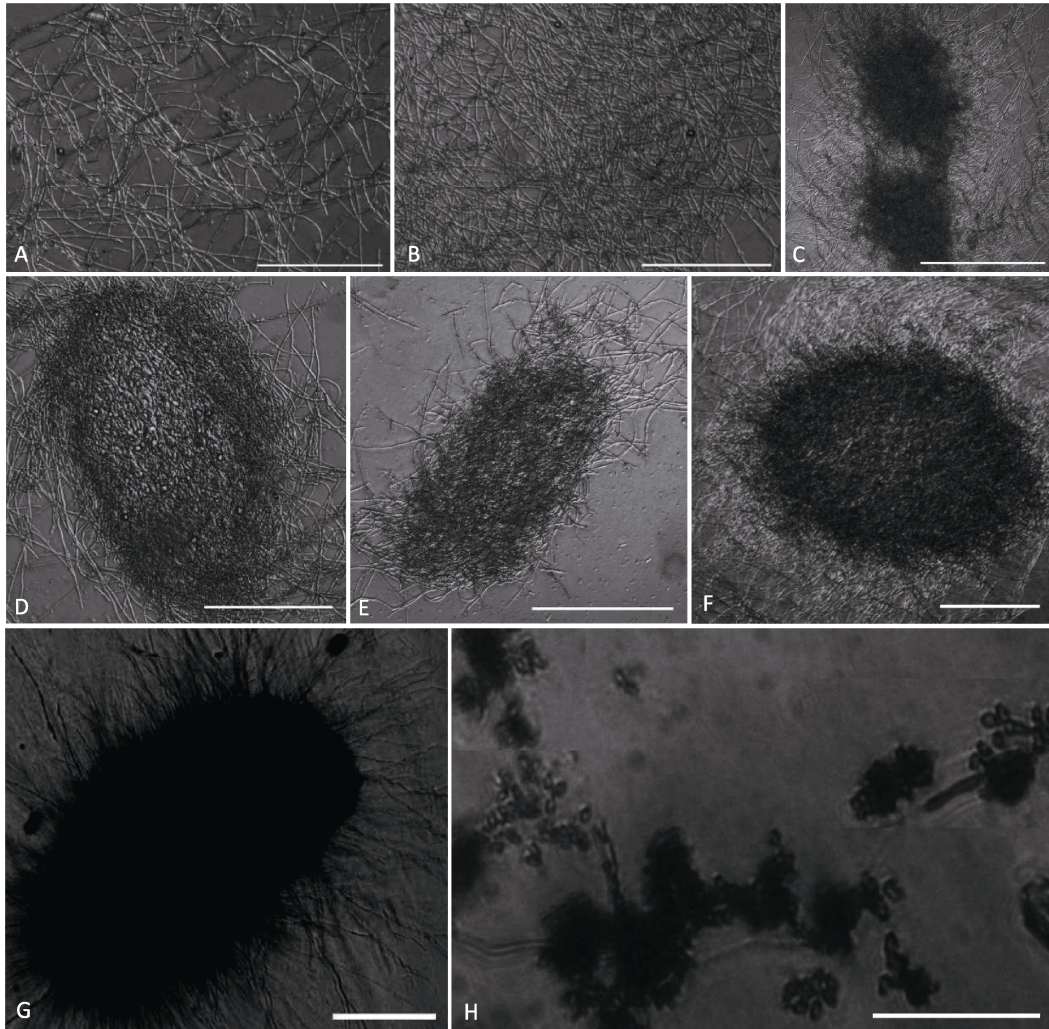


图 1 液体摇瓶深层培养时 Bbr17 菌株的发育及 MS-DE 菌核颗粒复水萌发和产孢 A: 第 1 天, 接入的分生孢子开始形成匀质的菌丝; B: 第 2 天, 菌丝开始聚集; C: 第 3 天, 菌丝大量聚集; D: 第 4 天, 开始形成菌核; E: 第 5 天, 继续形成菌核; F: 第 6 天, 发育完好的菌核; G: 菌核在水琼脂平板上复水 24h 后复苏; H: 菌核复水 192h 后开始产孢. 标尺: A、B、F、H=200 μ m; D、E=300 μ m; C、G=400 μ m.

Fig. 1 Sclerotial development in aerated liquid cultures of Bbr17 strain, germination and sporulation of rehydrated MS-DE granules. A: Day 1, conidial inocula germinate and produce a homogenous hyphal mass; B: Day 2, hyphae start gathering; C: Day 3, massive hyphae are gathering; D: Day 4, MS bodies begin to form; E: Day 5, MS bodies keep forming; F: Day 6, well developed MS; G: Reviving MS after 24h rehydration on water agar plates; H: Sporulating MS propagules, after 192h. Bars: A, B, F, H=200 μ m; D, E=300 μ m; C, G=400 μ m.

2.3 MS-DE 颗粒复水后的复苏及产孢

所有处理的 MS-DE 颗粒经复水后 90% 以上都能复苏和产孢 (表 1, 图 1-2), 但低碳浓度和高碳氮比有利于 MS 的复苏, 在 20:1 和 15:1 的碳氮比下复苏率都达到 100%, 显著高于中碳和高碳的处理。不同培养液对分生孢子产量也

有显著影响, 以高碳培养液诱导培养出的 MS 复水后产生分生孢子的数量多半显著高于低碳培养液产生的分生孢子数量, 其中以 10:1 的碳氮比下的产量显著高于其他处理。

2.4 发酵影响因子的进一步确定

在前期研究初步确定碳源浓度和碳氮比对

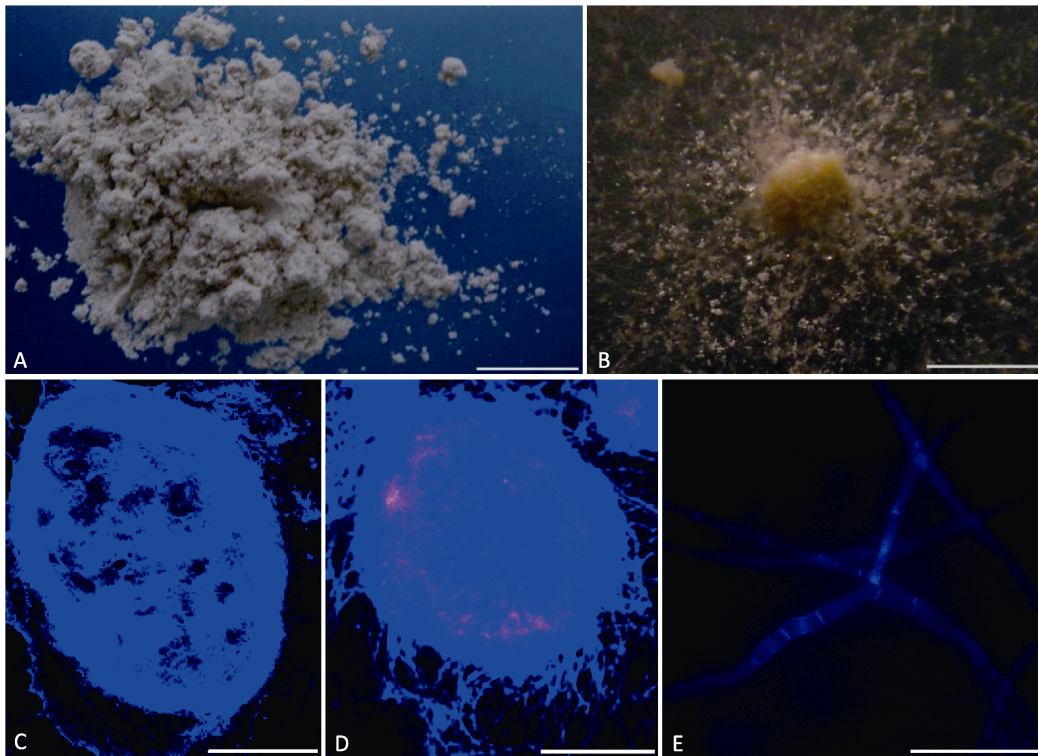


图 2 Bbr17 干燥的 MS-DE 粉末及在水琼脂平板上复水时的形态和复苏前后的 MS A: 干燥的 MS-DE 粉末, 标尺=1cm; B: 在水琼脂平板上复水的 MS-DE, 标尺=1mm; C-E: MS 荧光显微形态, calcofluor white 荧光染色: C: 培养第 6 天的菌核, 菌核外层菌丝聚集紧实, 表面光滑, 内层结构较疏松; D: 复水后菌核内部近表层的菌丝在复苏; E: 复水萌芽后菌核内外的菌丝. 标尺: C、D=200µm; E=40µm.

Fig. 2 Dried MS-DE powder and the morphology of MS-DE rehydrated on water agar and MS stained by calcofluor white under fluorescent microscope. A: Dried MS-DE powder, bar=1cm; B: Rehydrated MS-DE on water agar, bar=1mm; C-E: Morphology of MS stained with calcofluor white under fluorescence microscope. C: MS on day 6, showing a compact gregarious outer layer of mycelium and loose core in a MS; D: Reviving hyphae in and on a MS rehydrated on water agar; E: Hyphae inside a revived MS. Bars: C, D=200µm; E=40µm.

MS 材料影响较大的基础上,以部分因子试验进一步研究发酵的影响因子。选取碳源浓度 (A, g/L) 和碳氮比 (B) 体积与通常与发酵有关的接种量 (C, %)、装液量 (D, mL) 和转速 (E, r/min) 等 5 个因子进行两水平因子设计, MS 含量为响应值。结果的方差分析得 $R^2=0.999$, $AdjR^2=0.993$, 方程系数 R^2 为 $0.999>0.99$, 表明此方程有极显著的拟合度。在模型中, 碳源浓度 A ($P<0.01$) 是极显著因子; 碳氮比 B 及接种量 C ($P<0.05$) 是显著因子, 可信度高; 而装液量 D 和转速 E 是不显著因子

($P>0.05$), 可信度较低 (表 2)。

2.5 最陡爬坡试验

在两水平因子实验的基础上, 得出显著影响因子爬坡方向后, 进一步设计最陡爬坡试验来优化发酵参数。碳源浓度 (A)、碳氮比 (B) 和接种量 (C) 等显著因子为响应面分析自变量; 装液量 (D) 和转速 (E) 为可信度较低的不显著因子, 选择原始水平。最陡爬坡实验因子水平设计及结果表明, 在碳浓度 A 为 30g/L, 碳氮比 B 为 7:1, 接种量 C 为 1% 时 MS 产量最高, 并显著高于其他组, 因此确定此水平为响应面中心点 (表 3)。

表 2 碳源浓度、碳氮比、接种量、装液量和转速等 5 个因子在两水平下的 MS 产量和生物量

Table 2 MS production and biomass resulted from two levels of C concentration, C/N, inoculation amount, load and rotation speed

试验号 Test No.	A 碳源浓度 Carbon concentration (g/L)	B 碳氮比 Carbon to nitrogen ratio	C 接种量 Inoculation amount (%)	D 装液量 Load (mL)	E 转速 Rotation speed (r/min)	MS 产量 Microsclerotium production (10^2 MS/mL)	生物量 Biomass (g/L)
1	-1(10g/L)	-1(4:1)	-1(0.4%)	1(125mL)	1(200g)	15.83±0.80g	10.88±0.92g
2	1(30g/L)	-1	-1	-1(80mL)	-1(100g)	33.17±1.18d	22.41±1.02bc
3	-1	1(9:1)	-1	-1	1	21.00±0.84f	14.46±0.38def
4	1	1	-1	1	-1	41.00±1.66c	21.17±0.59c
5	-1	-1	1(0.9%)	1	-1	19.50±1.13f	13.75±0.91ef
6	1	-1	1	-1	1	41.67±1.17c	24.33±1.62a
7	-1	1	1	-1	-1	29.00±1.84e	15.38±0.47de
8	1	1	1	1	1	45.50±2.03b	23.50±0.57ab
9	0(20g/L)	0(6:1)	0(0.6%)	0(100mL)	0(150g)	52.00±1.49a	13.83±0.40f
10	0	0	0	0	0	52.50±1.45a	15.45±0.27d
K1 (MS)	21.33	24.50	27.75	31.21	30.67		
K2 (MS)	40.34	34.12	33.92	30.46	31.00		
极差 Range	19.01	9.62	6.17	-0.75	0.33		
P 值 P vaule	0.009	0.024	0.023	0.215	0.156		

2.6 中心组合试验

以 MS 产量为响应值的中心组合实验设计及所得 MS 产量见表 4。通过 Design-Expert 软件对实验数据进行二次多项回归拟合, 得到的布氏白

僵菌 MS 摇瓶培养参数的最优二次多项式回归模型为: $Y=80.50+3.65A+3.52B+1.90C-1.00AB+0.85AC-1.55BC-5.02A^2-2.32B^2-2.13C^2$ 。方差分析结果显示, $P_{\text{model}}=0.0011<0.01$, 该模型极显著; 经

表 3 最陡爬坡实验设计所得 MS 产量

Table 3 MS production resulted from a steepest ascent design

试验号 Test No.	A 碳源浓度 Carbon concentration (g/L)	B 碳氮比 Carbon to nitrogen ratio	C 接种量 Inoculation amount (%)	MS 产量 Microsclerotium production (10^3 MS/mL)
1	24	5:1	0.8	6.28±0.22c
2	27	6:1	0.95	7.08±0.12b
3	30	7:1	1.1	8.08±0.49a
4	33	8:1	1.25	5.17±0.24d

表 4 中心组合实验设计所得 MS 产量

Table 4 MS production resulted from a central composite design

试验号 Test No.	A 碳源浓度 Carbon concentration (g/L)	B 碳氮比 Carbon to nitrogen ratio	C 接种量 Inoculation amount (%)	MS 产量 Microsclerotium production (10^2 MS/mL)
1	32	8:1	1.1	78.83±1.20abc
2	28	8:1	1.1	75.00±1.86bcd
3	32	6:1	1.1	73.30±1.68de
4	28	6:1	1.1	67.50±0.81e
5	32	7:1	1.2	80.67±1.70ab
6	28	7:1	1.2	70.17±1.04de
7	32	7:1	1.0	74.80±0.62cde
8	28	7:1	1.0	67.67±2.05e
9	30	8:1	1.2	79.50±1.94ab
10	30	6:1	1.2	76.00±2.32bcd
11	30	8:1	1.0	79.20±0.99ab
12	30	6:1	1.0	65.50±1.83e
13	30	7:1	1.1	79.67±1.88ab
14	30	7:1	1.1	80.00±1.66ab
15	30	7:1	1.1	81.83±0.58a

分析计算, 该模型的决定系数为 0.9808, 修正决定系数为 0.9462, 表明模型与实际情况拟合良好, 具有较好的代表性, 可以对实验结果进行分析和预测。在各项中 A^2 、 A 、 B 、 C 的置信度均大于 0.99 ($P < 0.01$), 对 MS 的产生有极显著影响; B^2 、 C^2 的置信度均大于 0.95 ($P < 0.05$), 对 MS 的产生有显著作用。根据回归模型可以计算出, 当 $A=30.66\text{g/L}$ 、 $B=7.59:1$ 、 $C=1.03\%$ 时, MS 产量最高, 其理论最大值为 $8.24 \times 10^3 \text{MS/mL}$ 。

2.7 验证试验

分 3 个批次验证试验的结果, MS 产量分别为 $8.10 \times 10^3 \text{MS/mL}$ 、 $8.25 \times 10^3 \text{MS/mL}$ 和 $8.00 \times 10^3 \text{MS/mL}$, 差异在 1% 内。优化的结果比初始试验的最大值 $6.60 \times 10^3 \text{MS/mL}$ 提高 21%–25%。

3 讨论

前人制备植物病原菌 MS 既可通过固体培养 (Hawke & Lazarovits 1994), 也可通过深层发酵 (Jackson & Schisler 1995); 培养不同种类所需条件皆不相同。本研究诱导产生布氏白僵菌的 MS 所筛选出的培养基与金龟子绿僵菌 (Jackson & Jaronski 2009)、球孢白僵菌 (王海鸿等 2011) 和莱氏野村菌 (殷幼平等 2012) 均不相同。就碳氮比来看, 低碳会限制布氏白僵菌 MS 产量, 而富碳环境则利于其 MS 产量的提高, 这与金龟子绿僵菌 (Jackson & Jaronski 2009) 相同, 但和大丽轮枝菌和莱氏野村菌 (殷幼平等 2012) 恰恰相反。

MS 在硅藻土中显然可以受到保护, 经干燥处理储存 4 个月后可吸水复苏, 并产生大量孢子, 将这种制剂施如土壤中, 其分散性堪比布氏白僵菌的颗粒剂, 但颗粒剂储藏 1 个月活力便开始下降 (农向群和邓春生 1998), 因此

MS 的货架期要长得多。在土壤中, MS 颗粒在土壤含水量增加且温度适合时便会复苏、产孢, 而在土壤干旱时便会因其高度的抗旱性而长期宿存, 保持生命力。然而, 由于菌核中菌丝的复苏较为缓慢, 而且菌丝也不是侵染单元, 还必须在复苏后经历生理分化才能形成产孢细胞, 产生分生孢子, 因此侵染过程较为缓慢, 这在有关研究 (Jaronski & Jackson 2009; 王海鸿等 2011; 殷幼平等 2012) 中均可看出。因此, 希望通过淹没式施放 MS 迅速影响害虫种群似乎并不现实, 而接种式施放的应用方式则较为合适。这表明, 尽管经优化的摇瓶发酵工艺有望经中试试验而扩大生产规模, 但距 MS 的田间大量应用还有很长的路程要走。而且, 布氏白僵菌 MS-DE 制剂对目标害虫蛴螬的防治效果也有待通过试验来评价。

从生理上看, MS-DE 干燥后的状态是一种枯存 (marcescence) 的状态, 复水时菌丝吸水复苏, 恢复到生理活跃的状态, 然后分化出产孢结构, 产生分生孢子。这与曾在上世纪 80 年代风靡的昆虫病原真菌干菌丝制剂的复水、复苏和产孢过程 (Pereira & Roberts 1990) 相似。然而, 国内外在描述 MS 吸水复苏过程时有人使用“萌芽” (germination) 及“萌发率”的术语, 这种说法不妥。尽管在复苏过程中菌丝可能有萌芽现象发生, 但主要发生的过程还是干菌丝的吸水复苏。光滑的 MS 颗粒周围出现的菌丝 (图 1G), 其实主要是组成 MS 的原有的菌丝, 多半不是通过萌芽产生的。因此, 应避免使用“萌芽”和“萌发率”, 而应改称为“复苏” (revival) 和“复苏率”。

[REFERENCES]

- Amyotte SG, Dobinson KF, Grant S, Kang S, Klimes A, 2008. Microsclerotia development in *Verticillium dahliae*:

- regulation and differential expression of the hydrophobin gene VDH1. *Fungal Genetics and Biology*, 45(12): 1525-1532
- Bai YW, Hu DF, Hu QP, Yang JR, Zhao JX, Zhu HQ, 2011. Formation conditions for microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Mycosystema*, 30(5): 695-701 (in Chinese)
- Boyette CD, Bryson CT, Jackson MA, 2007. *Sesbania exaltata* biocontrol with *Colletotrichum truncatum* microsclerotia formulated in 'Pesta' granules. *Biological Control*, 52(3): 413-426
- Connick WJ, Jackson MA, Williams KS, Boyette CD, 1997. Stability of microsclerotial inoculum of *Colletotrichum truncatum* encapsulated in wheat flour-kaolin granules. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(5): 549-554
- Deng CS, Zhang AW, Nong XQ, Gao S, Jiang HL, Hu JW, Li JY, Tian JX, Li JG, 1995. Field experiment on *Beauveria brongniartii* to control white grub in groundnut field. *Chinese Journal of Biological Control*, 11(2): 56-59 (in Chinese)
- Dunlap CA, Heilman MA, Jackson MA, Palmquist DE, Shearer JF, 2011. The impact of temperature on the production and fitness of microsclerotia of the fungal bioherbicide *Mycoleptodiscus terrestris*. *Biocontrol Science and Technology*, 21(5): 547-562
- Faria MR, Wraight SP, 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43(3): 237-256
- Fravel DR, Tjamos EC, 1995. Detrimental effects of sublethal heating and *Talaromyces flavus* on microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, 85(4): 388-392
- Hao XC, Liu ZY, Wang B, Yu XB, 2006. The application of response surface methodology in optimization of microbial media. *Food Research and Development*, 27(1): 38-41 (in Chinese)
- Hawke MA, Lazarovits G, 1994. Production and manipulation of individual microsclerotia of *Verticillium dahliae* for use in studies of survival. *Phytopathology*, 84(9): 883-890
- Huang BL, Liang JN, Liu XY, Zhu H, Zhu F, 2004. Occurrence of eggplant wilt and factors affecting growth of *Verticillium dahliae*. *Acta Phytophylacica Sinica*, 31(2): 157-160 (in Chinese)
- Jackson MA, Jaronski ST, 2009. Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. *Mycological Research*, 113(8): 842-850
- Jackson MA, Jaronski ST, 2010. Composition of entomopathogenic fungus and method of production and application for insect control. U.S. Patent US2011/0038839
- Jackson MA, Schisler DA, 1995. Liquid culture production of microsclerotia of *Colletotrichum truncatum* for use as bioherbicidal propagules. *Mycological Research*, 99(7): 879-884
- Jaronski ST, Jackson MA, 2008. Efficacy of *Metarhizium anisopliae* microsclerotial granules. *Biocontrol Science and Technology*, 18(8): 849-863
- Lin HF, Lin SG, Wang QL, Yang XQ, Zhang L, Zhou YW, 2006. Growth of *Beauveria brongniartii* and two varieties of *Metarhizium anisopliae* and their virulence against white grubs. *Chinese Journal of Biological Control*, 22(2): 123-127 (in Chinese)
- Lv GY, Zhang ZF, Pan HJ, Fan LF, Li J, Fan MH, 2010. Optimization of submerged cultivation medium components for lentinan production by *Lentinula edodes* using response surface methodology. *Mycosystema*,

- 29(1): 106-112 (in Chinese)
- Manuel D, Rauyaree P, Ravindra G, Seogchan K, 2005. Mutations in VMK1, a mitogen-activated protein kinase gene, affect microsclerotia formation and pathogenicity in *Verticillium dahliae*. *Current Genetics*, 48(2): 109-116
- Nong QX, Deng CS, Gao S, Li JG, 1998. Colonization of *Paecilomyces lilacinus* on soybean root and its effect on rhizosphere micro-organisms. *Microbiology China*, 25(3): 136-139 (in Chinese)
- Pereira RM, Roberts DW, 1990. Dry mycelium preparations of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 56(1): 39-46
- Su P, Liao XL, Zhang J, Xue ZJ, 2009. Advance in controlling *Holotrichia diomphalia* by *Beauveria bassiana* in peanut field. *Guangxi Agricultural Sciences*, 40(4): 373-377 (in Chinese)
- Wang HH, Wang JL, Li YP, Liu X, Wen JZ, Lei ZR, 2011. Liquid culturing of microsclerotia of *Beauveria bassiana*, an entomopathogenic fungus to control western flower thrip, *Frankliniella occidentalis*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(3): 588-595 (in Chinese)
- Yin YP, Huang S, Song YZ, Wang ZK, 2012. Microsclerotia artificial inductions of *Nomuraea rileyi* CQNr01. *Scientia Agricultura Sinica*, 45(23): 4801-4807 (in Chinese)
- Zimmermann G, 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(6): 553-596
- [附中文参考文献]
- 白应文, 胡东芳, 胡小平, 赵俊兴, 朱荷琴, 杨家荣, 2011. 大丽轮枝孢微菌核的形成条件. 菌物学报, 30(5): 695-701
- 邓春生, 张爱文, 农向群, 高松, 李俊国, 蒋海林, 胡继武, 田家祥, 李玖玉, 1995. 卵孢白僵菌对花生蛴螬的田间防治效果. 中国生物防治, 11(2): 56-59
- 黄奔立, 朱华, 朱凤, 梁继农, 刘兴艳, 2004. 茄子黄萎病的发生及病菌生长影响因子. 植物保护学报, 31(2): 157-160
- 郝学财, 余晓斌, 刘志钰, 王蓓, 2006. 响应面方法在优化微生物培养基中的应用. 食品研究与开发, 27(1): 38-41
- 吕国英, 张作法, 潘慧娟, 范雷法, 李娟, 范勤海, 2010. 响应面分析法优化香菇多糖发酵培养基. 菌物学报, 29(1): 106-112
- 林华峰, 王萍莉, 张磊, 杨新军, 李世广, 周义文, 2006. 布氏白僵菌和金龟子绿僵菌两变种的生长性状的及其对蛴螬的毒力测定. 中国生物防治, 22(2): 123-127
- 农向群, 邓春生, 高松, 李俊国, 1998. 布氏白僵菌菌丝制剂的贮存活力. 微生物学通报, 25(3): 136-139
- 苏品, 廖晓兰, 张亚, 薛正杰, 2009. 白僵菌防治花生地蛴螬研究综述. 广西农业科学, 40(4): 373-377
- 王海鸿, 王晶玲, 李银平, 刘旋, 问锦曾, 雷仲仁, 2011. 防治西花蓟马的病原真菌-白僵菌微菌核的液体培养. 应用昆虫学报, 48(3): 588-595
- 殷幼平, 黄姗, 宋章永, 王中康, 2012. 莱氏野村菌 CQNr01 微菌核的人工诱导培养. 中国农业科学, 45(23): 4801-4807