

# 碳量和碳氮比对白僵菌生长及产孢的影响

夏吉星,李新民,刘春来,刘兴龙,王克勤,王爽,邵天玉

(黑龙江省农业科学院 植物保护研究所,黑龙江 哈尔滨 150086)

**摘要:**为探究球孢白僵菌规模化生产路径,以葡萄糖、蛋白胨及无机盐为固体基础培养基,研究碳量( $8\sim24\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )和C/N(10:1~100:1)对5株球孢白僵菌菌株生长和产孢的影响。结果表明:除B72菌株外,其余菌株在C/N为10:1的条件下,最适宜菌株的生长。B76菌株在碳量为 $24\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,C/N为20:1的营养条件,最适宜B72菌株的生长。适宜B72和B76菌株的产孢条件均为碳量 $24\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、C/N20:1;B70、B246和B252菌株的最适产孢条件分别为碳量 $24\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、C/N40:1,碳量 $8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、C/N10:1和碳量 $16\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、C/N60:1。培养基中C/N对球孢白僵菌菌株生长和孢子形成影响作用高于碳量,低C/N营养条件利于多数菌株的生长和孢子形成。

**关键词:**球孢白僵菌;碳量;碳氮比;生长;产孢量

中图分类号:S476+.12

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2012)11-0062-05

球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)为重要的害虫生防真菌,国内外已开发出多种剂型的球孢白僵菌杀虫剂广泛用于农林害虫的防治<sup>[1]</sup>。研究表明,不同来源的球孢白僵菌不仅具有一定的寄主专化性,其生物学特性也存在一定差异<sup>[2-3]</sup>。生防真菌的有效侵染体分生孢子是真菌杀虫剂的主要活性成分,而分生孢子可在人工培养基上进行大量繁殖与生产,适宜的营养条件可以促进白僵菌生长,提高其产孢水平,增强其杀虫活性<sup>[4-6]</sup>。该文研究了碳量及C/N等营养条件对源于俄罗斯的不同球孢白僵菌菌株的生长、产孢的影响,为球孢白僵菌的规模化生产提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株及来源 供试的5株球孢白僵菌B70、B72、B76、B246、B252菌株由俄罗斯全俄植物保护研究所提供。

1.1.2 培养基 基础培养基为K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>1 g,KCl 0.5 g,MgSO<sub>4</sub> 0.5 g,FeSO<sub>4</sub> 0.01 g,琼脂20 g,水1 000 mL,pH7。供试培养基以葡萄糖和蛋白胨为培养基的碳源和氮源,分别在碳量为8、16和 $24\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基中,设置C/N为10:1、20:1、

40:1、60:1、80:1和100:1的处理,121℃高压灭菌30 min。

### 1.2 方法

1.2.1 接种菌液制备 将保存的斜面菌株接种于PDA斜面培养基上,25℃活化96 h。挑取活化后的菌株接种于PD液体培养基中,25℃,180 r·min<sup>-1</sup>条件下培养96 h。利用血球计数板测定各菌株的芽生孢子产量,用无菌水调整菌液的孢子浓度为 $10^7\text{ 个}\cdot\text{mL}^{-1}$ 备用。

1.2.2 菌株接种及培养 将灭菌后培养基在超净工作台中倒入平皿中( $\Phi=9\text{ cm},15\text{ mL}\cdot\text{皿}^{-1}$ ),将已灭菌的滤纸( $\Phi=7\text{ cm}$ )(Whatman International Ltd Maidstone England)平铺于培养基平板中央,室温放置3 d,剔除污染平板后,取10 μL菌液接种于培养皿滤纸中央,25℃恒温培养14 d。每个处理重复3次。

1.2.3 菌株生物量和产孢量测定 称取生长在滤纸表面菌落的重量,并用无菌手术刀将其转移至装有灭菌的10 mL 0.05%吐温80溶液试管中。涡旋振荡器震荡混匀5 min,使孢子充分分散,利用血球计数板测定孢子产量。

1.2.4 数据处理 应用SAS 9.1软件对球孢白僵菌菌丝生长和产孢量的数据进行单因素方差分析,通过LSD方法比较各处理间的差异显著性( $P=0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 碳量和碳氮比对菌株菌丝生长的影响

碳量和C/N对球孢白僵菌的菌丝生长都存

收稿日期:2012-08-30

基金项目:科技部国际科技合作资助项目(2011RR0001)

第一作者简介:夏吉星(1985-),男,黑龙江省巴彦县人,硕士,研究实习员,从事农业害虫与生物防治研究。E-mail:jixingxia@126.com。

通讯作者:李新民(1964-),男,甘肃省成县人,硕士,研究员,从事微生物农药和生物防治研究。E-mail:xinmin63@yahoo.com.cn。

在显著的影响( $P>0.05$ ) (见表 1), 但总体来看 C/N 的影响效果更为明显。当 C/N 为 10:1 时, 最适宜球孢白僵菌的菌丝生长。不同菌株最适宜

菌丝生长的碳量不同, 其中最适宜菌株 B72 和 B76 菌丝生长的碳量为  $24 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 而 B70、B246 和 B252 菌株最适宜菌丝生长的碳量为  $16 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表 1 碳量和 C/N 对白僵菌生长的影响

Table 1 Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen(C/N) ratio on *Beauveria bassiana* growth on agar culture

处理 Treatment		菌株/mg·菌落 <sup>-1</sup> <i>Beauveria bassiana</i>				
		B70	B72	B76	B246	B252
碳量/g·L <sup>-1</sup> Carbon concentration	8	600.7	532.7	602.0	475.3	404.5
	16	740.5	673.5	784.1	776.7	797.9
	24	709.3	718.2	1021.2	705.8	794.3
C/N	LSD1	96.8	45.9	176.8	112.0	99.0
	10:1	560.5	564.8	777.0	757.2	796.6
	20:1	468.5	537.0	598.1	453.4	439.5
	40:1	334.5	236.3	364.9	270.9	244.5
	60:1	249.0	262.7	280.1	206.4	303.3
	80:1	216.8	166.7	207.2	136.9	136.7
	100:1	221.1	156.9	179.9	133.1	76.1
	LSD2	59.7	53.9	38.6	78.8	57.5

注: 表中为 3 次重复平均值; LSD1 表示在不同碳量条件下的标准差; LSD2 表示在不同 C/N 条件下的标准差。下同。

Note: Values are means of three replicates. LSD1 stands for standard deviation of different carbon concentrations at the same strain; LSD2 stands for standard deviation of different C/N at the same strain. The same below.

碳量和 C/N 的相互作用对球孢白僵菌的菌丝生长也存在显著的影响( $P<0.05$ ) (见表 2)。在碳量相同 C/N 不同和 C/N 相同碳量不同的情况下, 球孢白僵菌的菌丝生长表现出明显的区别。最适于 B70、B246 和 B252 菌株菌丝生长的碳量和 C/N 相同, 均为碳量  $16 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、C/N 10:1, 菌丝生物量分别为  $716.1 \text{ mg} \cdot \text{菌落}^{-1}$ 、 $964.6 \text{ mg} \cdot \text{菌落}^{-1}$  和  $1114.6 \text{ mg} \cdot \text{菌落}^{-1}$ 。当碳量为  $24 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、C/N 为 20:1 时, 最适于 B72 菌株的菌丝生长, 菌丝生物量为  $729.9 \text{ mg} \cdot \text{菌落}^{-1}$ 。最适于 B76 菌株菌丝生长条件为碳量  $24 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、C/N 10:1, 其菌丝生物量达到了  $863.0 \text{ mg} \cdot \text{菌落}^{-1}$ 。

## 2.2 碳量和碳氮比对菌株产孢的影响

碳量和 C/N 对球孢白僵菌产孢同样存在着明显的影响(见表 3)。但两个影响因素中, C/N 对球孢白僵菌产孢影响更为显著。这与 C/N 对球孢白僵菌菌丝生长影响相似, 但不同菌株最适产孢的 C/N 不尽相同。最适于 B70 菌株产孢的 C/N 为 40:1; B72 和 B76 菌株则均为 20:1, 而最

适于 B246 和 B252 菌株产孢的 C/N 分别为 100:1 和 60:1。除菌株 B246 和 B252 外, 碳量对其余的球孢白僵菌产孢存在显著的影响( $P<0.05$ )。当碳量为  $24 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 均最适于 B70、B72 和 B76 菌株的产孢, 而最适于 B246 和 B252 菌株产孢的碳量则分别为  $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $16 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

碳量和 C/N 的相互作用对球孢白僵菌的产孢也存在显著的影响( $P<0.05$ ) (见表 4)。除 B72 菌株外, 其余各球孢白僵菌菌株的最适产孢条件与最适的生长条件也有所不同。B72 与 B76 菌株的最适产孢条件相同, 为碳量  $24 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、C/N 20:1; 产孢量为  $4.0 \times 10^9 \text{ 个} \cdot \text{菌落}^{-1}$  和  $3.0 \times 10^9 \text{ 个} \cdot \text{菌落}^{-1}$ 。当碳量为  $24 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、C/N 为 40:1 时, 最适于 B70 菌株的产孢, 产孢量达到了  $3.6 \times 10^9 \text{ 个} \cdot \text{菌落}^{-1}$ 。B246 菌株的最适产孢条件为碳量  $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、C/N 10:1, 产孢量为  $6.8 \times 10^7 \text{ 个} \cdot \text{菌落}^{-1}$ 。最适于 B252 菌株的产孢条件为碳量  $16 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、C/N 60:1, 测得的产孢量为  $1.2 \times 10^8 \text{ 个} \cdot \text{菌落}^{-1}$ 。

表 2 碳量和 C/N 相互作用对白僵菌生长的影响

Table 2 Effects of interaction between carbon concentration and carbon to nitrogen(C/N)ratio on *Beauveria bassiana* growth on agar culture

菌种 Strain	碳量/g·L <sup>-1</sup> Carbon concentration	菌丝生物量/mg·菌落 <sup>-1</sup> Mycelial biomass						LSD1	LSD3		
		C/N									
		10:1	20:1	40:1	60:1	80:1	100:1				
B70	8	503.6	402.2	231.5	258.7	153.7	252.1	127.6			
	16	716.1	474.7	338.0	219.6	286.9	186.1	116.2			
	24	461.9	528.5	434.0	268.8	209.7	224.9	102.5			
	LSD2	190.5	75.3	114.8	128.5	75.3	103.0		107.9		
B72	8	545.5	299.3	149.9	265.6	175.1	162.6	61.5			
	16	690.7	581.9	260.6	231.0	148.2	108.1	106.8			
	24	458.2	729.9	298.3	291.5	176.8	199.9	64.2			
	LSD2	133.1	52.5	90.7	40.6	52.5	33.1		74.7		
B76	8	758.2	306.5	162.2	263.2	184.7	131.0	118.4			
	16	709.8	662.1	330.5	254.7	205.9	189.2	85.9			
	24	863.0	825.8	602.0	322.5	231.0	219.6	73.1			
	LSD2	170.0	84.0	54.6	48.4	84.0	54.7		87.9		
B246	8	582.5	244.7	215.9	170.1	66.6	146.1	62.0			
	16	964.6	550.2	283.0	174.5	240.0	117.8	193.1			
	24	724.4	565.4	313.7	274.6	104.1	135.3	172.9			
	LSD2	332.0	71.9	107.7	53.6	71.9	74.9		143.2		
B252	8	463.1	236.4	172.7	221.2	86.6	33.3	120.2			
	16	1114.6	530.7	205.9	341.7	131.6	69.1	163.8			
	24	812.1	551.2	354.9	346.9	191.8	125.9	90.5			
	LSD2	258.4	76.7	69.8	118.4	76.7	44.1		119.5		

注:LSD3 表示不同的碳量和不同的 C/N 相互作用的情况下标准差。下同。

Note:LSD3 stands for standard deviation of interactions of different carbon concentrations and C/N within the same isolate. The same below.

表 3 碳量和 C/N 对白僵菌产孢的影响

Table 3 Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen(C/N)ratio on *Beauveria bassiana* sporulation on agar culture

处理 Treatment	产孢量/10 <sup>7</sup> 个·菌落 <sup>-1</sup> Sporulation					
	B70	B72	B76	B246	B252	
碳量/g·L <sup>-1</sup> Carbon concentration	8	114.5	202.8	178.1	5.7	6.7
	16	269.9	321.5	301.5	4.0	10.2
	24	383.1	442.8	411.6	3.9	7.3
	LSD1	48.8	77.0	104.0	3.7	6.3
C/N	10:1	150.9	269.7	227.2	3.0	1.5
	20:1	185.1	330.6	231.3	1.7	3.3
	40:1	200.6	158.3	139.0	1.5	0.5
	60:1	119.1	100.8	143.5	2.0	8.4
	80:1	63.3	63.3	86.4	1.5	3.7
	100:1	48.5	44.6	63.8	4.0	6.9
	LSD2	41.7	50.1	58.7	1.9	2.6

表 4 碳量和 C/N 相互作用对白僵菌产孢的影响

Table 4 Effects of interaction between carbon concentration and carbon to nitrogen(C/N)ratio on *Beauveria bassiana* sporulation on agar culture

菌种 Strain	碳量/g·L <sup>-1</sup> Carbon concentration	产孢量/10 <sup>7</sup> 个·菌落 <sup>-1</sup> Sporulation						LSD1	LSD3		
		C/N									
		10:1	20:1	40:1	60:1	80:1	100:1				
B70	8	79.5	132.0	71.5	28.6	17.2	14.8	35.9			
	16	260.0	164.0	171.0	121.0	50.4	44.6	105.0			
	24	113.0	260.0	360.0	208.0	122.0	86.2	61.9			
	LSD2	128.0	60.6	109.0	79.8	25.4	42.5		68.3		
B72	8	240.3	277.3	25.6	38.5	13.6	13.6	116.0			
	16	310.7	310.3	176.7	87.9	45.4	34.0	92.3			
	24	258.3	404.0	273.3	175.7	130.9	86.2	123.0			
	LSD2	205.0	193.0	84.0	38.9	63.3	39.0		104.0		
B76	8	255.0	179.7	35.6	45.4	7.2	12.1	44.5			
	16	239.6	210.7	160.7	126.8	98.6	68.3	126.0			
	24	187.7	304.3	221.0	258.0	153.7	110.6	100.0			
	LSD2	195.0	156.0	61.0	46.8	30.0	33.1		89.7		
B246	8	6.8	3.1	1.0	2.0	2.4	1.9	4.7			
	16	1.3	0.9	1.1	2.1	1.4	5.4	3.1			
	24	1.0	1.2	2.3	1.9	0.9	4.7	3.5			
	LSD2	6.5	2.5	2.2	1.9	3.4	6.5		3.6		
B252	8	2.5	2.5	0.5	7.2	3.0	4.3	4.7			
	16	1.1	4.0	0.7	11.5	5.2	8.1	5.6			
	24	0.8	3.3	0.2	6.6	2.9	8.2	5.3			
	LSD2	2.1	6.7	0.8	10.0	2.3	7.0		4.8		

### 3 结论与讨论

已有研究报道,人工合成培养基中碳、氮营养条件显著影响着生防真菌的生长、孢子形成、孢子活力、毒力及酶活等<sup>[4,7]</sup>。该研究结果表明,培养基中 C/N 对球孢白僵菌的菌丝生长和孢子形成影响作用高于碳量。在 C/N 为 10:1~20:1 的营养条件下,5 株球孢白僵菌株的菌丝生长最旺盛,生物量在 716.1~1 114.6 mg·菌落<sup>-1</sup>。随 C/N 的提高,各菌株的菌丝生长量呈现出下降的趋势。S. A. Safavi 等人对不同来源的 3 株白僵菌的研究也表明,在低 C/N(10:1)培养基上菌丝生长速度最快<sup>[7]</sup>。低 C/N 营养条件同样适宜多数菌株产孢,5 株菌株中,B72 菌株在 C/N 为 20:1 营养条件下,产孢量最高,达到  $4.0 \times 10^9$  个·菌落<sup>-1</sup>。

对其它生防真菌如厚垣普奇尼娅菌、玫色拟青霉、金龟子绿僵菌等研究也证实低 C/N 的培养条件下,有助于生防真菌的产孢<sup>[3,8-9]</sup>。有关碳、氮营养条件对球孢白僵菌孢子活力、毒力和酶活的影响有待进一步深入研究。

### 参考文献:

- [1] 杨帆,宋钢,特木钦,等.白僵菌及其微胶囊剂孢子活力及对沙棘木蠹蛾幼虫的[J].内蒙古农业大学学报,2010,31(2): 179-182.
- [2] Aquino de Muro M, Mehta S, Moore D. The use of amplified fragment length polymorphism for molecular analysis of *Beauveria bassiana* isolates from Kenya and other countries, and their correlation with host and geographical origin[J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 229 (2): 249-257.
- [3] 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.

- [4] Gao Li, Sun Man H, Liu Xing Z, et al. Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi[J]. Mycological research, 2007, 111(1): 87-92.
- [5] 高利, 刘杏忠, 宗兆锋. 碳浓度及碳氮比对几种生防真菌孢子萌发的作用[J]. 植物保护学报, 2009, 36(1): 93-94.
- [6] 李农昌, 樊美珍, 李春如. 白僵菌有关培养条件及其与毒力关系的研究[J]. 安徽农业大学学报, 1996, 23(3): 254-259.
- [7] Safavi S A, Shah F A, Pakde A K. Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* [J]. Federation of European Microbiological Societies, 2007, 270: 116-123.
- [8] Mo Minghe, Xu Chuankun, Zhang Keqin. Effects of carbon and nitrogen sources, carbon-to-nitrogen ratio, and initial pH on the growth of nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* in liquid culture[J]. Mycopathologia, 2005, 159: 381-387.
- [9] Gao L, Liu Z. A novel two-stage cultivation method to optimize carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio for sporulation of biocontrol fungi[J]. Folia Microbiol, 2009, 54(2): 142-146.

## Effects of Carbon Concentration and Ratio of Carbon to Nitrogen on the Growth and Sporulation of *Beauveria bassiana*

XIA Ji-xing, LI Xin-min, LIU Chun-lai, LIU Xing-long, WANG Ke-qin, WANG Shuang, SHAO Tian-yu

(Plant Protection Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

**Abstract:** For the purpose of exploring the scale production path of *Beauveria bassiana*, taking solid basal medium composed of glucose, peptone and salts, the effects of carbon concentration and ratio of carbon to nitrogen on the growth and sporulation of five strains of *Beauveria bassiana* were studied. The results showed that except for the B72, all the *B. bassinana* strains attained the best growth at a C/N of 10:1, when the carbon concentration was 24 g•L<sup>-1</sup> for B76, 16 g•L<sup>-1</sup> for B70, B246 and B252. The optimal conditions for B72 growth were 24 g•L<sup>-1</sup> carbon concentration with a C/N of 20:1. The highest spore yields conditions for B72 and B76 were 24 g•L<sup>-1</sup> carbon concentration with a C/N of 20:1. The optimal conditions for sporulation were 24 g•L<sup>-1</sup> carbon concentration with a C/N of 40:1 for B70, 8 g•L<sup>-1</sup> carbon concentration with a C/N of 10:1 for B246 and 16 g•L<sup>-1</sup> carbon concentration with a C/N of 60:1 for B252, respectively. The results indicated that the C/N had more influence on *B. bassinana* growth and sporulation than the carbon concentration, low C/N was conducive to most *B. bassinana* growth and sporulation.

**Key words:** *Beauveria bassiana*; carbon concentration; ratio of carbon to nitrogen; growth; sporulation

(该文作者还有杨帆, 单位为黑龙江省农业科学院对俄中心)

### 欢迎订阅 2013 年《果树学报》

《果树学报》是中国农业科学院郑州果树研究所主办的国家级学术期刊, 中国农林水产类权威学术期刊, 中文园艺学核心期刊, 中国科技核心期刊, 已被美国化学文摘、俄罗斯文摘杂志、英国CABI等20余种国内外重要数据库收录。据《中国科技期刊引证报告》统计结果, 《果树学报》的影响因子达0.954, 已成为国内外有影响的学术期刊之一。《果树学报》着重选发密切结合我国果树科研、教学、生产实际, 反映学科学术水平和发展动向的优秀稿件, 及时报道重大科研成果、阶段性成果和科研进展情况。栏目设置有品种资源·遗传育种·分子生物学·栽培·生理·生态·植物保护·果品质量与安全·贮藏·加工·专论与综述·技术与方法·新品种选育报告等。读者对象为果树学科的科研人员、高等农业院校师生及基层果树管理技术人员。本刊为双月刊, 2013年每期160页码, 定价20.00元, 全年6期共120.00元。邮发代号: 36-93, 国际代号BM/1107。欢迎投稿, 欢迎订阅。

编辑部地址: 中国农业科学院郑州果树研究所 邮编: 450009

电话: 0371-63387308 传真: 0371-63387308 E-mail: chinagsxb@163.com