

不同碳、氮源对球孢白僵菌生长及产孢的影响

王 爽,李新民,刘春来,王克勤,刘兴龙,夏吉星,杨 帆

(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:为白僵菌规模化生产和开发利用,以含碳量 $8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的葡萄糖、含氮量 $0.29\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的蛋白胨及无机盐为固体基础培养基,用蔗糖等 3 种碳源(酵母膏等 4 种氮源)分别等量取代基础培养基中的葡萄糖(蛋白胨),研究了不同碳、氮源对 5 株球孢白僵菌菌株的菌丝生长和产孢的影响。结果表明,葡萄糖或麦芽糖对菌株 B70、B72 和 B76 的生长和产孢明显优于其它碳源,相对于无机氮源,有机氮更利于上述菌株孢子的形成。菌株 B76 在生物量和产孢上对氮源的利用表现出明显的选择性,硫酸铵显著促进菌丝的生长,而玉米浆更利于孢子形成,其生物量及产孢量分别为 $645.7\text{ mg}\cdot\text{菌落}^{-1}$ 和 $3.6\times 10^9\text{ 孢子}\cdot\text{菌落}^{-1}$ 。菌株 B246、B252 在研究设定的碳氮营养条件下,产孢量明显低于其它菌株,但多糖类可溶性淀粉作为碳源或硝酸钠为氮源显著促进了菌株的生长,菌丝生长旺盛,以硝酸钠为氮源菌株 B246、B252 生物量最高,分别达 $1\ 188.6\text{ mg}\cdot\text{菌落}^{-1}$ 和 $1\ 180.5\text{ mg}\cdot\text{菌落}^{-1}$,表现出对碳氮源利用的特异性。

关键词:球孢白僵菌;碳源;氮源;菌丝生长;产孢量

中图分类号:S476+.12

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2013)08-0047-04

球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)是一种分布广泛、可侵染寄生 750 余种昆虫的昆虫病原真菌^[1]。各种分子生物学方法研究证实球孢白僵菌同一菌种不同来源的球孢白僵菌菌株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^[2-5]。王成树等对球孢白僵菌在萨氏(SDAY)培养基上菌丝生长和产孢研究表明,球孢白僵菌不同菌株宏观培养特性表现出高度的多样性^[6]。因此,作为以分生孢子为主要活性成分的白僵菌杀虫剂,充分了解其营养生长特性,并在人工培养基进行大量繁殖和生产是生物农药成功应用的前提^[7-9]。通过对来源于俄罗斯的不同球孢白僵菌菌株的菌丝生长、产孢所需碳氮源的比较研究,明确菌株培养的营养特征,为规模化培养和开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及来源 5 株球孢白僵菌菌株分别为 B70、B72、B76、B246、B252,由俄罗斯全俄植物

保护研究所提供。

1.1.2 培养基 试验所用培养基有 3 种,即基础培养基葡萄糖 20 g,蛋白胨 2 g, K_2HPO_4 1 g, KCl 0.5 g, MgSO_4 0.5 g, FeSO_4 0.01 g, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL, pH 为 7。

碳源培养基以基础培养基中含碳量 $8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 为标准,分别用蔗糖、麦芽糖和可溶性淀粉三种碳源取代基础培养基中的葡萄糖,使各种培养基碳元素的含量为 $8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,以基础培养基作为对照。

氮源培养基以基础培养基含氮量 $0.29\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 为标准,分别用酵母膏、玉米浆、 NaNO_3 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 种氮源取代基础培养基中的蛋白胨,使各种培养基氮元素的含量为 $0.29\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,基础培养基作为对照。

1.2 方法

1.2.1 接种菌液制备 将保存于斜面的菌株活化,并接种于 PDA 液体培养基中,置 25°C 、转速 $160\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养,96 h 后,用血球计数板测定芽生孢子产量,用无菌水调整菌液浓度为 10^7 孢子 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 备用。

1.2.2 菌株接种及培养 接种前,用小镊子将已灭菌的直径为 70 mm 的滤纸(Whatman International Ltd Maidstone England)覆盖于培养基中央,室温放置 3 d,剔除污染平板后,取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 菌液接种于培养皿滤纸中央,置 25°C 恒温培养 14 d,

收稿日期:2012-11-06

基金项目:基金项目国际科技合作资助项目(2009DFR30630)

第一作者简介:王爽(1981-),女,黑龙江省哈尔滨市呼兰区人,硕士,助理研究员,从事微生物农药和生物防治研究。E-mail:wslovegyn0@163.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。

重复 3 次。

1.2.3 菌株生物量和产孢量测定 生长在滤纸表面的菌落称重后,用无菌铲将菌落移至含 0.05%吐温 80 的 10 mL 无菌水中,振荡 1 min 后,再用超声波震动 15~20 s,使孢子充分分散,血球计数板测定每菌落的孢子产量。

1.2.4 数据处理 应用 SAS6.12 统计软件包对数据进行单因素方差分析和组间比较采用 LSD 检验进行统计处理。

2 结果与分析

2.1 不同碳源菌株生长和产孢

以可溶性淀粉为碳源,B246 和 B252 菌株菌丝生长显著优于其它菌株与碳源的组合,培养 14 d 后,菌落生长量分别为 800.6 mg·菌落⁻¹和 917.1 mg·菌落⁻¹,表现出对碳源具有明显的选择性。在所研究的 4 种碳源间,除 B76 菌株的菌落生长量无显著差异外,相比较其它碳源,葡萄糖或麦芽糖明显的利于 B70 和 B72 菌株菌丝的生长(见表 1)。

表 1 蛋白胨为氮源的不同碳源球孢白僵菌菌株生长

Table 1 Effect of different carbon sources on mycelial growth of *Beauveria bassiana* on peptone-based medium

菌株 Strain	生物量/mg·菌落 ⁻¹ Biomass				LSD1
	可溶性淀粉 Soluble starch	麦芽糖 Maltose	蔗糖 Sucrose	葡萄糖 Glucose	
B70	318.1	423.3	247.2	428.2	107.9
B72	269.8	456.0	328.9	424.7	151.5
B76	405.4	397.4	378.6	410.6	163.4
B246	800.6	354.0	380.3	245.3	215.2
B252	917.1	382.0	391.8	278.1	128.4
LSD2	184.1	139.3	145.2	135.4	

注:表中数据为 3 次重复平均值,LSD1 表示同一菌株不同碳源标准差;LSD2 表示同一碳源不同菌株标准差。下同。

Note: Values are means of three replicates. LSD1 stands for standard bias of different carbon sources at the same strain; LSD2 stands for standard bias of different strains at the same carbon source.

不同碳源培养条件下的菌株产孢结果表明,葡萄糖和麦芽糖碳源均有利于 B70、B72 和 B76 菌株孢子的形成,其中 B72 和 B76 菌株,分别以葡萄糖、麦芽糖为碳源,产孢量最高,分别为 2.19×10^9 孢子·菌落⁻¹和 2.48×10^9 孢子·菌落⁻¹。

而 B246、B252 菌株在所研究的碳源组分中,产孢量相对较低,除以可溶性淀粉为碳源产孢量分别为 4.35×10^8 孢子·菌落⁻¹、 4.15×10^8 孢子·菌落⁻¹,其它碳源的产孢量低于或接近 10^8 孢子·菌落⁻¹(见表 2)。

表 2 蛋白胨为氮源的不同碳源球孢白僵菌菌株产孢量

Tabel 2 Effect of different carbon sources on sporulation of *Beauveria bassiana* on peptone-based medium

菌株 Strain	产孢量/ $\times 10^7$ 孢子·菌落 ⁻¹ Spores yield				LSD1
	可溶性淀粉 Soluble starch	麦芽糖 Maltose	蔗糖 Sucrose	葡萄糖 Glucose	
B70	60.6	135.8	55.0	194.8	77.6
B72	96.7	205.0	160.4	218.8	139.0
B76	162.5	247.9	154.2	170.8	117.0
B246	43.5	5.0	6.3	8.4	29.3
B252	41.5	16.8	4.0	3.5	42.6
LSD2	72.2	79.3	96.8	101.0	

2.2 不同氮源菌株生长和产孢

以葡萄糖为碳源,不同氮源菌株菌丝生长见表 3。以酵母膏和玉米浆为氮源时,尽管菌株 B246 和 B252 菌落的生物量显著高于以蛋白胨为氮源基础培养基的生物量,但硝酸钠为氮源显著促进了菌丝生长,在所有的菌株和氮源组合中,

菌株 B246 和 B252 生物量最高,分别达到了 1 188.58 和 1 180.54 mg·菌落⁻¹,表现出对氮源的选择性。同一菌株不同氮源间,菌株 B76 以硫酸铵为氮源,菌丝的生长明显优于其它 4 种氮源,菌落生长量达 645.7 mg。以硝酸钠为氮源,菌株 B70 菌丝的生物量为 481.8 mg·菌落⁻¹,与以蛋白

胨为氮源的基础培养基的生长无显著差异,但显著地高于其它 3 种氮源。菌株 B72 以有机氮(酵母膏、玉米浆和蛋白胨)为氮源,菌落生物量显著地高于无机氮源的菌落生物量。

表 3 葡萄糖为碳源不同氮源球孢白僵菌菌株生长

Table 3 Effect of different nitrogen sources on mycelial growth of *Beauveria bassiana* on glucose-based medium

菌株 Strain	生物量/mg·菌落 ⁻¹ Biomass					LSD1
	酵母膏 Yeast extract	硫酸铵 Ammonium sulphate	硝酸钠 Sodium nitrate	玉米浆 Corn steer liquor	蛋白胨 Peptone	
B70	357.2	326.4	481.8	294.9	428.2	123.8
B72	456.9	283.4	388.8	415.0	424.7	121.1
B76	484.8	645.7	451.6	389.1	410.6	139.5
B246	470.9	386.5	1188.6	446.6	245.3	155.1
B252	510.4	362.4	1180.5	646.6	278.1	181.1
LSD2	138.1	137.8	201.2	96.9	135.4	

从见表 4 看出,以玉米浆为氮源,菌株 B76 产孢量显著高于其它菌株与氮源的组合,达到 3.61×10^9 孢子·菌落⁻¹。其次是 B72 菌株,以酵母膏为氮源,产孢量为 3.27×10^9 孢子·菌落⁻¹。B70 菌株在蛋白胨、酵母膏和玉米浆为氮源的产孢量差异不显著,产孢量在以蛋白胨为氮源的基础培养基上最高,达 1.95×10^9 孢子·菌落⁻¹,显著高于硫酸铵和硝酸钠为氮源的孢子产量。与无机

氮源相比,B70、B72、B76 菌株在有机氮源中均表现出较好的产孢能力,表明有机氮源利于白僵菌分生孢子的形成。在所有的菌株和氮源组合中,菌株 B246 和 B252 产孢量较低,且菌株与各氮源及菌株间孢子产量无差异,分别在硫酸铵和硝酸钠为氮源产孢量较高,为 7.9×10^8 孢子·菌落⁻¹和 1.2×10^8 孢子·菌落⁻¹。

表 4 葡萄糖为碳源不同氮源球孢白僵菌产孢量

Table 4 Effect of different nitrogen sources on sporulation of *Beauveria bassiana* on glucose-based medium

菌株 Strain	产孢量/ $\times 10^7$ 孢子·菌落 ⁻¹ Spores yields					LSD1
	酵母膏 Yeast extract	硫酸铵 Ammonium sulphate	硝酸钠 Sodium nitrate	玉米浆 Corn steer liquor	蛋白胨 Peptone	
B70	175.2	91.3	101.5	159.2	194.8	86.9
B72	327.1	65.2	117.1	233.3	218.8	69.0
B76	175.0	120.8	147.9	360.8	170.8	135.0
B246	18.0	79.0	12.5	7.6	8.4	78.0
B252	7.2	9.4	11.8	2.7	3.5	9.9
LSD2	81.3	107.0	42.3	80.4	101.0	

3 讨论

陆晴等研究发现,球孢白僵菌 HFW205 菌株对单糖和双糖的利用明显优于多糖^[10-11],较多针对某一菌株的碳源利用的研究报道^[7,11-12]认为,葡萄糖适合白僵菌的生长。在氮源利用上,多数研究结果表明,相对于无机氮,有机氮源更能促进分生孢子的形成^[10,13]。该研究中以葡萄糖或麦芽糖作为碳源时,菌株 B70、B72 和 B76 的菌丝生长及产孢量相对较高,而分别以蛋白胨、酵母膏或玉米浆作氮源,菌株表现出相对高的孢子产量,表明大多数菌株在碳源和氮源的利用上更偏向于单糖(或双糖)和有机氮的特征。菌株 B76 在葡萄糖为碳源时,氮源硫酸铵显著的促进菌株的生长,而氮源玉米浆更

有利于该菌株的产孢,表现出同一菌株菌丝的生长和孢子的形成对氮源利用不同。Li 和 Holdom^[14]根据 2 株绿僵菌菌株的菌落直径大小和产孢量,除大豆蛋白胨在菌株生长和产孢显著优于其它氮源外,将硝酸钾、硝酸胺、硫酸铵及氨基酸等 18 种氮源分成 4 组,其中利于菌丝生长而产孢弱,反之亦然的研究结果,同样表明对氮源利用也具有选择性。与其他菌株在本研究设定碳氮源组合产孢量相比,尽管 B246、B252 产孢量明显处于劣势,但多糖类可溶性淀粉作为碳源或无机硝态氮硝酸钠为氮源显著促进了菌株的生长,菌丝生长旺盛,生物产量最高,表现出对碳氮源利用的特异性。

该研究是在固定基础培养基的碳源葡萄糖或

氮源蛋白胨的基础上,分别进行不同氮源或碳源球孢白僵菌菌株间生长及产孢研究,有关营养条件如不同碳氮比等对球孢白僵菌生长和产孢的影响有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Inglis D G, Goettel S M. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests[C]. In Fungi as Biocontrol Agents (T. M. Butt, C. Jackson & N. Magan, eds) CAB International, Wallingford, 2001; 23-69.
- [2] Maurer P, Couteaudier Y, Girard P A, et al. Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range [J]. Mycological Research, 1997, 101: 159-164.
- [3] Aquino de Muro M, Mehta, David Moore. 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: 249-257.
- [4] Wang C S, Shah. Molecular investigation on strain genetic relatedness and population structure of *Beauveria bassiana* [J]. Environmental Microbiology, 2003, 5: 908-915.
- [5] Wang S B, Miao X X, Zhao W G, et al. Genetic diversity and population structure among strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR) [J]. Mycological Research, 2005, 109 (12): 1634-1372.
- [6] 王成树, 黄勃, 王四宝, 等. 球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 培养特征多样性与寄主及地理来源的相关性分析[J]. 生物多样性, 2002, 10(2): 196-201.
- [7] 高利. 液体与固体培养几种生防真菌的营养研究[J]. 中国生物防治, 2009, 25(4): 322-327.
- [8] Gao L, Sun M H, Liu X Z. Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi [C]. mycological research III. 2007: 87-92.
- [9] Uzma Mustafa, Gurvinder Kaur. Effects of carbon and nitrogen sources and ratio on the germination, growth and sporulation characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates [J]. African Journal of Agricultural Research Vol. 2009, 3(10): 922-930.
- [10] 陆晴, 曹伟平, 董建臻, 等. 不同碳、氮营养对球孢白僵菌 HFW205 的生长及胞外蛋白酶产量的影响[J]. 华北农学报, 2008, 23(5): 142-146.
- [11] 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, 22(5): 365-368.
- [12] 孔琼, 袁盛勇, 王传铭, 等. 营养成分对球孢白僵菌生长的影响[J]. 红河学院学报, 2008, 6(5): 37-39.
- [13] 邓春生, 高松, 高铁山, 等. 卵孢白僵菌营养需求及培养条件研究[J]. 中国生物防治, 1996, 12(4): 165-167.
- [14] Li D P, Holdom D G. Effect of nutrients on colony formation, growth, and sporulation of *Metarhizium anisopliae* [J]. (Deuteromycotina, Hyphomycetes) Journal of Invertebrate Pathology, 1995, 65: 253-260.

The Effects of Different Carbon or Nitrogen Sources on Mycelial Growth and Sporulation of *Beauveria bassiana*

WANG Shuang, LI Xin-min, LIU Chun-lai, WANG Ke-qin, LIU Xing-long, XIA Ji-xing, YANG Fan
(Plant Protection Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: For the large-scale production of *Beauveria bassiana*, development and utilization, based on defined basal medium composed of glucose (8.0 g·L⁻¹ carbon), peptone (0.29 g·L⁻¹ nitrogen), and etc, five isolates of the *Beauveria bassiana* were cultured on solid agar media which glucose or peptone in basal medium were substituted by various carbon sources (sucrose, maltose, and soluble starch) or nitrogen sources (yeast extract, corn steer liquor, sodium nitrate and ammonium sulphate) at the same of C or N concentrations of basal medium respectively. The effect of carbon or nitrogen sources on mycelial growth and sporulation of isolates was evaluated via measurement of biomass and spore yield. The results showed that isolates B70, B72 and B76 exhibited commendable biomass and spore yield which cultured with glucose or maltose, and it was significantly better than those cultured with other carbon sources. Compared with the inorganic nitrogen, organic nitrogen were more suitable for sporulation of B70, B72 and B76. There were obvious selective utilization of nitrogen sources between mycelium growth and sporulation of strain B76, the growth of mycelium was evidently promoted by ammonium sulphate in which the biomass was 645.7 mg·colony⁻¹, and corn steer liquor could increase the sporulation quantity in which sporulation was 3.6×10⁹ conidia·colony⁻¹. Under the experimental condition, the spore yield of strain B246 and B252 were markedly lower than the other isolates', but the biomass of the colony increased significantly by polysaccharide soluble starch as C source or inorganic salt sodium nitrate as N source. The highest biomass (1 188.6 and 1 180.5 mg·colony⁻¹) was obtained from the strain B246 and B252 which were cultured with the sodium nitrate as the nitrogen source, exhibited the specificity of utilization for carbon and nitrogen source.

Key words: *Beauveria bassiana*; carbon sources; nitrogen source; mycelial growth; sporulation

(该文作者还有邵天玉、徐充和张举梅,单位同第一作者)