

文章编号: 1001-1498(2010)01-0102-06

松褐天牛成虫高毒力绿僵菌菌株筛选 及液体振荡培养条件

潘永胜^{1,2}, 徐福元^{2*}, 韩正敏³, 刘云鹏²

(1. 江苏省宿迁市林业局, 江苏 宿迁 223800; 2. 江苏省林业科学研究院, 江苏 南京 211153;

3. 南京林业大学森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037)

摘要: 对3株绿僵菌菌株通过不同温度水浴处理, 发现了孢子的萌发条件; 并开展了3菌株对松褐天牛成虫的毒力测定, 筛选出Ma₇₈₉菌株的致病力较强。通过正交试验对其液体振荡培养条件进行了分析, 选出了菌丝体生长最适培养基为蔗糖 20 g · L⁻¹, 酵母粉 10 g · L⁻¹, KH₂PO₄ 3.0 g · L⁻¹, MgSO₄ · 7H₂O 1.0 g · L⁻¹, CaCl₂ 0.5 g · L⁻¹; 培养液生孢子最适培养基为蔗糖 20 g · L⁻¹, 蛋白胨 10 g · L⁻¹, KH₂PO₄ 1.5 g · L⁻¹, MgSO₄ · 7H₂O 2.0 g · L⁻¹, CaCl₂ 0.5 g · L⁻¹。

关键词: 金龟子绿僵菌; 松褐天牛; 毒力测定; 液体振荡培养

中图分类号: S763

文献标识码: A

Studies on the Screening and Liquid Shake Culture Condition of High Virulent *Metarhizium anisopliae* against *Monochamus alternatus* Hope Adults

PAN Yong-sheng^{1,2}, XU Fu-yuan², HAN Zheng-min³, LIU Yun-peng²

(1. Suqian Forestry Bureau of Jiangsu Province, Suqian 223800, Jiangsu, China; 2. Forestry Academy of Jiangsu Province, Nanjing 211153,

Jiangsu, China; 3. College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract: The germination percentage with different temperatures water bath treatment and virulent against *Monochamus alternatus* of different *Metarhizium anisopliae* were measured in this paper. The results showed that *Metarhizium anisopliae*₇₈₉ (Ma₇₈₉) was the most virulent one. Conditions of liquid shake culture to Ma₇₈₉ were studied by orthogonal test, the optimum liquid medium recipe was sucrose 20 g · L⁻¹, yeast-extract paste 10 g · L⁻¹, KH₂PO₄ 3.0 g · L⁻¹, MgSO₄ · 7H₂O 1.0 g · L⁻¹, CaCl₂ 0.5 g · L⁻¹ for mycelium culture; but for yielding spore, the optimum liquid medium recipe was sucrose 20 g · L⁻¹, peptone 10 g · L⁻¹, KH₂PO₄ 1.5 g · L⁻¹, MgSO₄ · 7H₂O 2.0 g · L⁻¹, CaCl₂ 0.5 g · L⁻¹.

Key words: *Metarhizium anisopliae*; *Monochamus alternatus*; toxicity test; liquid shake culture condition

松材线虫病 *Bursaphelenchus xylophilus* (Sterner et Buhner) Nickle, 又称松树萎蔫病, 其致病快、防治难、传播蔓延迅速, 是松树 (*Pinus* spp.) 的一种毁灭性病害, 在世界上被列为重要的危险性森林病害, 国内外对此都非常重视。在松材线虫病的传媒天牛

中, 以松褐天牛 (*Monochamus alternatus* Hope) 的传播效率最高。松褐天牛在健康松树上取食补充营养或在衰弱的松树上产卵时, 松材线虫通过伤口侵入到松树体内而得病。故防治松褐天牛是有效控制松材线虫病的重要手段。由于松褐天牛幼虫生活隐

收稿日期: 2008-05-15

基金项目: 松材线虫病生物治理技术的推广应用(国家林业局科技成果推广项目编号:[2006]21号)

作者简介: 潘永胜(1980—), 男, 山东青州人, 硕士, 研究方向: 从事森林病虫害防治研究。

* 通讯作者: 徐福元(1955—), 男, 江苏吴县人, 研究员, 博士。研究方向: 长期从事森林病虫害研究。E-mail: xufuyua@yahoo.com.cn

蔽、成虫羽化期长, 化学防治困难且污染环境^[1-3], 而真菌杀虫剂具有使用安全、不污染环境、可扩散流行和害虫不易产生抗性等优点, 是国内生物防治的研究重点^[4]。本文选用几株产孢好的绿僵菌菌株对松褐天牛成虫进行生物测定, 旨在筛选出对松褐天牛成虫具有高毒力的菌株, 并进一步通过正交试验对其液体振荡培养条件进行研究, 以期探索出最优配方, 为其液体培养提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

金龟子绿僵菌 (*Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok.): Ma₇₈₈、Ma₇₈₉, 由中国林科院提供; 金龟子绿僵菌: Ma₄₂, 由安徽农业大学提供。

1.2 不同温度处理后分生孢子萌发力测定

孢子萌发培养基配方: 马铃薯 200 g · L⁻¹, 葡萄糖 20 g · L⁻¹, 琼脂 18 g · L⁻¹。

方法: 绿僵菌在 PDA 培养基平板上培养两周, 超净工作台前用接种铲取绿僵菌孢子于装有无菌水的三角瓶中, 浓度约为 10⁶ 个 · mL⁻¹, 用小型涡旋式搅拌器振荡均匀, 然后分别放于温度系列为 25、30、35、40 的水浴锅中加热 12 h。用无菌毛刷蘸取灭菌过的孢子萌发培养基均匀涂布于无菌载玻片上成一薄层, 然后用无菌移液管取不同温度处理过的孢子悬浮液于载玻片的培养基薄层上, 再用涂布棒涂布均匀, 置于 25 培养箱中培养 18 h, 统计萌发力。实验设 3 个重复, 每个重复各统计 100 个以上的孢子^[5]。

1.3 供试昆虫

松褐天牛 (*M. alternatus*) 成虫, 一部分用诱笼和引诱剂采于江苏省林科院后山; 另一部分从病死松木中劈出幼虫, 带回实验室, 25 ~ 30 自然羽化而得。收集到一定数量后挑选健康的松褐天牛成虫放入 100 mL 锥形瓶中, 每瓶一只用于室内毒力测定。

1.4 室内毒力测定

将供试菌株 Ma₄₂、Ma₇₈₈、Ma₇₈₉ 的分生孢子粉分别用无菌水制成浓度梯度为 1.0 × 10⁷ ~ 1.0 × 10⁵ 个孢子 · mL⁻¹ 的孢子悬浮液, 以无菌水为对照, 每个处理设 3 个重复, 每重复 10 头试虫。本试验采用浸渍法接种, 将试虫在孢子悬浮液中浸 1 s 进行接种, 对照浸蘸无菌水。处理后的试虫放入装有新鲜马尾松 (*P. massoniana* Lamb.) 松枝的锥形瓶中, 每日更换松枝, 瓶内放一湿棉球保持湿度, 温度控制在

25 ~ 28 , 每天定期记录死亡虫数, 连续测定观察 15 天。

1.5 对供试虫毒力选优菌株的液体振荡培养

1.5.1 液体母种的培养 PD(马铃薯 200 g · L⁻¹, 葡萄糖 20 g · L⁻¹) 培养基 100 mL 装于 250 mL 三角瓶, 灭菌后, 接培养好的斜面菌种, 25 , 150 r · min⁻¹ 培养 2 天, 高速分散匀浆后 4 保存, 以备液体振荡培养菌丝体使用。

1.5.2 最适氮源筛选 分别以 10 g · L⁻¹ 的蛋白胨、尿素、牛肉膏、磷酸氢二铵、麦麸、黄豆粉、酵母粉作氮源, 20 g · L⁻¹ 的葡萄糖作碳源, 无机盐为 KH₂PO₄ 2.0 g · L⁻¹, MgSO₄ · 7H₂O 1.0 g · L⁻¹, CaCl₂ 0.5 g · L⁻¹ 制培养基。

1.5.3 最适碳源筛选 分别以 20 g · L⁻¹ 的葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、白砂糖、淀粉、红糖作碳源, 10 g · L⁻¹ 的蛋白胨作氮源, 无机盐为 KH₂PO₄ 2.0 g · L⁻¹, MgSO₄ · 7H₂O 1.0 g · L⁻¹, CaCl₂ 0.5 g · L⁻¹ 制培养基。

1.5.4 正交试验 分别以上面筛选出的碳源、氮源和 KH₂PO₄、MgSO₄ · 7H₂O 为 4 因素进行正交试验, 从而获得最优碳氮源组合液体培养基配方。

1.5.5 液体振荡培养菌丝体 菌丝生长量用干物质称量法测定^[6]。按上面配方制备各培养基, 100 mL 锥形瓶中装入 45 mL 培养基, 灭菌后无菌条件接入 5 mL 液体母种, 放于 25 摇床中 150 r · min⁻¹ 振荡培养 3 天, 然后将菌丝体过滤, 放入 60 烘箱内烘干 24 h, 称质量, 每组重复 3 次。

1.5.6 液体振荡培养孢子 按 1.5.4 中配方制备各培养基, 100 mL 锥形瓶中装入 50 mL 培养基, 灭菌后无菌条件接入 1 mL 浓度为 1.0 × 10⁶ 个孢子 · mL⁻¹ 孢子悬浮液, 放于 25 摇床中 150 r · min⁻¹ 振荡培养 5 天后, 血球计数板统计液生孢子数目, 每组重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 不同温度处理后分生孢子萌发力

从表 1 可以看出, 绿僵菌 3 菌株在 30 水浴处理后与在 25 水浴处理后的孢子萌发力差别不大, 均表现出高萌发率, 经 35 水浴处理后, Ma₄₂ 萌发率下降为 82%, Ma₇₈₈、Ma₇₈₉ 萌发率下降到 75% 以下, 而经 40 水浴处理后, 3 菌株萌发力均大幅度下降, 尤其是 Ma₇₈₉, 其孢子萌发率骤降到 16.8%, 从中还可以看出 3 菌株中耐高温较强的是 Ma₄₂、

Ma_{788} , 而 Ma_{789} 耐高温性较差。

表 1 不同温度处理后各绿僵菌菌株孢子萌发力 %

绿僵菌菌株	不同温度处理			
	25	30	35	40
Ma_{42}	96.405	95.928	82.367	25.382
Ma_{788}	97.931	96.073	72.939	33.790
Ma_{789}	97.264	95.900	71.269	16.809

表 2 绿僵菌对松褐天牛成虫的致病力

绿僵菌菌株	孢子浓度 / (个 · mL ⁻¹)	回归方程	相关系数	LT ₅₀ / d	LC ₅₀ / (个 · mL ⁻¹)
Ma_{42}	1.0 × 10 ⁷	$Y=0.0643x-0.3362$	0.9285	13.0047	
	1.0 × 10 ⁶	$Y=0.0147x-0.0562$	0.8411	37.8367	4.78 × 10 ⁶
	1.0 × 10 ⁵	$Y=0.0094x-0.0397$	0.8497	57.4149	
Ma_{788}	1.0 × 10 ⁷	$Y=0.0804x-0.3473$	0.9718	10.5386	
	1.0 × 10 ⁶	$Y=0.0247x-0.1133$	0.8931	24.8300	1.63 × 10 ⁶
	1.0 × 10 ⁵	$Y=0.0173x-0.0853$	0.8192	33.8324	
Ma_{789}	1.0 × 10 ⁷	$Y=0.0878x-0.4087$	0.9121	10.3497	
	1.0 × 10 ⁶	$Y=0.0369x-0.1629$	0.9463	17.9648	0.97 × 10 ⁶
	1.0 × 10 ⁵	$Y=0.0240x-0.1150$	0.9580	25.6250	

2.3 液体振荡培养

2.3.1 氮源筛选 氮源筛选试验结果(图1,表3)

表明, Ma_{789} 菌株液体振荡培养时对不同氮源的利用情况不同, 除牛肉膏和黄豆粉之间无差异外, 它们与其他氮源之间差异极显著 ($\alpha=0.01$), Ma_{789} 利用有机氮的能力要强于无机氮, 有机氮中酵母粉利用最好, 对氮源的利用依次为酵母粉 > 蛋白胨 > 牛肉膏 > 黄豆粉 > 麦麸 > 磷酸氢二铵 > 尿素。

表 3 氮源筛选结果

氮源	菌丝体干质量 / g	显著性	
		0.05	0.01
酵母粉	0.95167 ± 0.012055	a	A
蛋白胨	0.78800 ± 0.021703	b	B
牛肉膏	0.72000 ± 0.002646	c	C
黄豆粉	0.70333 ± 0.009609	c	C
麦麸	0.63533 ± 0.011060	d	D
磷酸氢二铵	0.42267 ± 0.033171	e	E
尿素	0.13967 ± 0.004041	f	F

注: 同列数据后的相同字母表示在 Duncan 新复极差测验的比较中差异不显著, 不同小写字母间差异显著 ($\alpha=0.05$), 不同大写字母间差异极显著 ($\alpha=0.01$), 表 4 同。

2.3.2 碳源筛选 从图 2 可以看出, Ma_{789} 菌株可广泛利用各种碳源, 其利用碳源的差异情况没有氮源那样显著, 利用碳源顺序是白砂糖 > 葡萄糖 > 淀粉 > 蔗糖 > 麦芽糖 > 红糖 > 乳糖。 Ma_{789} 菌株利用碳源的具体差异情况见表 4 中显著性分析。

2.2 对松褐天牛成虫的毒力测定

从表 2 可以看出, 3 菌株对松褐天牛成虫均表现一定的毒力, 但致病力存在一定的差异, 从致死中时间 LT₅₀、致死中浓度 LC₅₀ 和回归曲线的斜率都可以看出, 它们的毒力强弱为 $Ma_{789} > Ma_{788} > Ma_{42}$ 。因此, 选用毒力最强的菌株 Ma_{789} 作进一步的液体振荡培养研究。

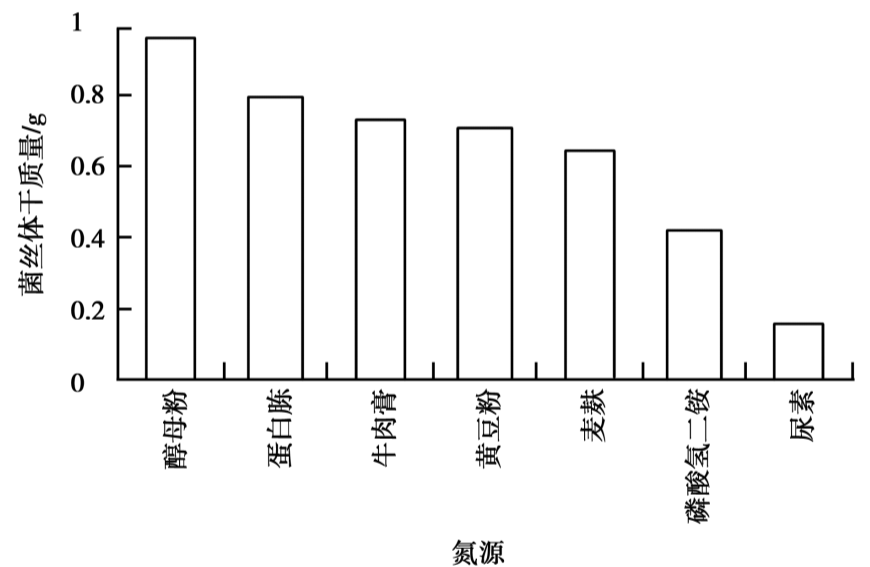


图 1 不同氮源对 Ma_{789} 菌丝体干质量的影响

注: 菌丝体干质量为 45 mL 液体培养基中接入 5 mL 液体母种培养烘干后的质量。图 2 及以下同。

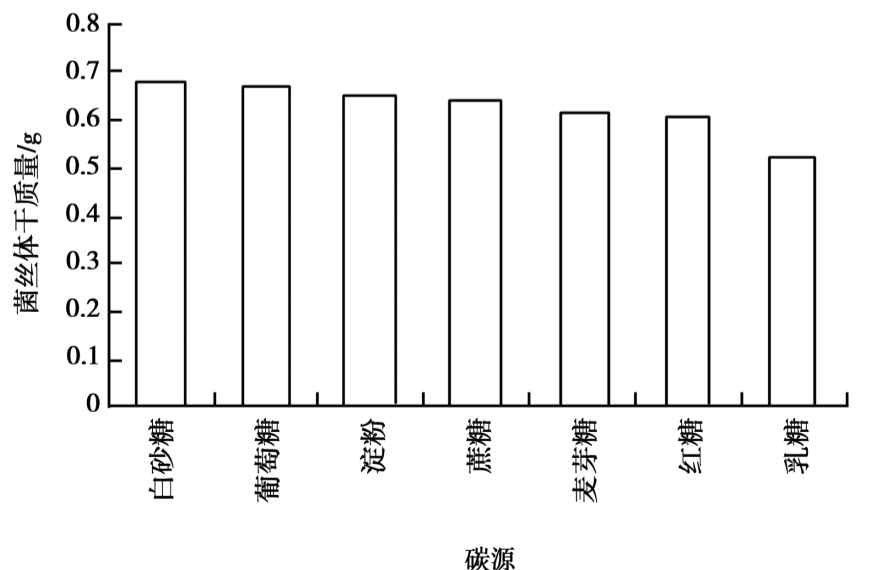


图 2 不同碳源对 Ma_{789} 菌丝体干质量的影响

表 4 碳源筛选结果

碳源	菌丝体干质量/g	显著性	
		0.05	0.01
白砂糖	0.675 67 ±0.015 503	a	A
葡萄糖	0.668 67 ±0.030 925	ab	AB
淀粉	0.650 33 ±0.022 502	abcd	ABC
蔗糖	0.634 33 ±0.023 116	bcd	ABC
麦芽糖	0.615 33 ±0.015 144	cd	BC
红糖	0.605 33 ±0.015 275	d	C
乳糖	0.515 33 ±0.017 954	e	D

2.3.3 正交试验 从碳氮源筛选试验中, 筛选出白砂糖、葡萄糖、淀粉、蔗糖为碳源因素的 4 个水平, 酵

母粉、蛋白胨、牛肉膏、黄豆粉为氮源因素的 4 个水平, 它们与 KH_2PO_4 和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 两因素进行 $L_{16}(4^4)$ 正交试验。正交试验因素水平见表 5。正交试验中每组试验进行 3 个重复, 其设计和结果见表 6。

表 5 $L_{16}(4^4)$ 正交试验因素水平分析

项目	碳源(A)	氮源(B)	KH_2PO_4 (C)	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (D)
水平 1	白砂糖	蛋白胨	1.5 g · L ⁻¹	1.0 g · L ⁻¹
水平 2	淀粉	黄豆粉	2.0 g · L ⁻¹	1.5 g · L ⁻¹
水平 3	葡萄糖	酵母粉	2.5 g · L ⁻¹	2.0 g · L ⁻¹
水平 4	蔗糖	牛肉膏	3.0 g · L ⁻¹	2.5 g · L ⁻¹

表 6 $L_{16}(4^4)$ 正交试验设计与结果

试验号	因素				菌丝体干质量/g			产孢量/(×10 ⁹ 个·L ⁻¹)		
	A	B	C	D	1	2	3	1	2	3
1	1	1	1	1	0.818	0.790	0.850	5.35	4.95	5.75
2	1	2	2	2	0.480	0.498	0.497	0.85	0.95	1.10
3	1	3	3	3	0.787	0.830	0.774	4.60	4.30	5.15
4	1	4	4	4	0.772	0.836	0.779	3.65	2.90	3.35
5	2	1	2	3	0.763	0.739	0.713	8.20	8.55	7.90
6	2	2	1	4	0.586	0.647	0.690	3.90	4.45	3.75
7	2	3	4	1	1.119	1.154	1.113	6.45	6.60	7.00
8	2	4	3	2	0.706	0.625	0.695	5.10	5.50	4.80
9	3	1	3	4	0.691	0.654	0.625	7.55	7.10	6.85
10	3	2	4	3	0.450	0.483	0.460	2.65	2.45	3.00
11	3	3	1	2	0.745	0.759	0.752	5.65	6.05	5.45
12	3	4	2	1	0.498	0.502	0.511	4.40	5.05	4.65
13	4	1	4	2	0.897	0.904	0.909	10.40	10.95	9.85
14	4	2	3	1	0.779	0.660	0.710	4.45	4.65	4.90
15	4	3	2	4	1.082	1.216	1.045	9.30	8.75	9.60
16	4	4	1	3	0.642	0.644	0.643	7.25	6.95	7.00

正交试验所得数据用 DPS 软件进行分析处理, 其极差分析、差异显著性和方差分析结果见表 7 ~ 10^[7]。

由表 7 分析可知, 氮源因素的极差 R 值最大, 对 Ma_{789} 液体振荡培养影响较大, 其次是碳源, 而无机盐浓度因素对其液体培养影响相对较小。

表 7 正交试验极差分析结果

项目	碳源(A)	氮源(B)	KH_2PO_4 (C)	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (D)
水平 1	0.726/3.575	0.779/7.783	0.714/5.542	0.792/5.350
水平 2	0.796/6.017	0.578/3.092	0.712/5.775	0.706/5.554
水平 3	0.594/5.071	0.948/6.575	0.711/5.413	0.661/5.667
水平 4	0.844/7.838	0.654/5.050	0.823/5.771	0.802/5.929
极差 R	0.250 1/4.262 5	0.369 7/4.691 7	0.111 7/0.362 5	0.141 2/0.579 2
调整 R	0.225/3.836 25	0.333/4.222 50	0.100/0.326 25	0.127/0.521 25

注: a/b = 菌丝生长量 g/液生分生孢子产量 ×10⁹ 个 · L⁻¹。

由表 8 可以看出, 在液体振荡培养菌丝体研究中, A 因素的第 4 水平 > 第 2 水平 > 第 1 水平 > 第 3 水平, 且 A 因素的第 4 水平与其他 3 水平的差异都是显著的, 所以 A 因素的最优选择为 A_4 ; B 因素的第 3 水平 > 第 1 水平 > 第 4 水平 > 第 2 水平, 且各

水平间的差异都是极显著的, 故 B 因素的最优选择为 B_3 ; C 因素的第 4 水平 > 第 1 水平 > 第 2 水平 > 第 3 水平, 且第 4 水平与其他 3 水平间的差异都是极显著的, 故 C 因素的最优选择为 C_4 ; D 因素的第 4 水平 > 第 1 水平 > 第 2 水平 > 第 3 水平, 但第 4 水

平与第 1 水平间的差异不显著,考虑到经济原因,故 D 因素的最优选择为 D₁,所以液体振荡培养 Ma₇₈₉ 菌丝体的最优组合为 A₄B₃C₄D₁,即蔗糖 20 g · L⁻¹,酵

母粉 10 g · L⁻¹, KH₂PO₄ 3.0 g · L⁻¹, MgSO₄ · 7H₂O 1.0 g · L⁻¹, CaCl₂ 0.5 g · L⁻¹。

表 8 正交试验处理因素各水平间差异显著性 SSR 检验(菌丝体培养)

A 水平	均值	5% 显著水平	1% 极显著水平	B 水平	均值	5% 显著水平	1% 极显著水平	C 水平	均值	5% 显著水平	1% 极显著水平	D 水平	均值	5% 显著水平	1% 极显著水平
4	0.844 25	a	A	3	0.948 00	a	A	4	0.823 00	a	A	4	0.801 92	a	A
2	0.795 83	b	A	1	0.779 42	b	B	1	0.713 83	b	B	1	0.792 00	a	A
1	0.725 92	c	B	4	0.654 42	c	C	2	0.712 00	b	B	2	0.705 58	b	B
3	0.594 17	d	C	2	0.578 33	d	D	3	0.711 33	b	B	3	0.660 67	c	B

表 9 正交试验处理因素各水平间差异显著性 SSR 检验(产孢培养)

A 水平	均值	5% 显著水平	1% 极显著水平	B 水平	均值	5% 显著水平	1% 极显著水平	C 水平	均值	5% 显著水平	1% 极显著水平	D 水平	均值	5% 显著水平	1% 极显著水平
4	7.837 50	a	A	1	7.783 33	a	A	2	5.775 00	a	A	4	5.929 17	a	A
2	6.016 67	b	B	3	6.575 00	b	B	4	5.770 83	a	A	3	5.666 67	ab	AB
3	5.070 83	c	C	4	5.050 00	c	C	1	5.541 67	ab	A	2	5.554 17	bc	AB
1	3.575 00	d	D	2	3.091 67	d	D	3	5.412 50	b	A	1	5.350 00	c	B

而在液体培养产孢研究表 9 中, A 因素的第 4 水平 > 第 2 水平 > 第 3 水平 > 第 1 水平, 且 A 因素的第 4 水平与其他 3 水平的差异都是极显著的, 所以 A 因素的最优选择为 A₄; 同理可知 B 因素的最优选择为 B₁; C 因素的第 2 水平 > 第 4 水平 > 第 1 水平 > 第 3 水平, 4 水平间只在 5% 显著水平上有所差

异, 考虑到经济因素, 选择 C 因素的第 1 水平; 同理, D 因素的最优选择为第 3 水平。所以 Ma₇₈₉ 产液生孢子的最佳液体培养基配方为蔗糖 20 g · L⁻¹、蛋白胨 10 g · L⁻¹、KH₂PO₄ 1.5 g · L⁻¹, MgSO₄ · 7H₂O 2.0 g · L⁻¹, CaCl₂ 0.5 g · L⁻¹。

表 10 正交试验方差分析(随机区组模型)

变异来源	自由度	$F_{0.05}^{[8]}$	$F_{0.01}^{[8]}$	菌丝生长量			液生孢子产量		
				平方和	均方	F 值	平方和	均方	F 值
区组	2			0.001 0	0.000 51		0.005 9	0.002 97	
A	3	2.92	4.51	0.425 4	0.141 80	98.756 03	114.697 9	38.232 64	299.285 15
B	3	2.92	4.51	0.939 3	0.313 11	218.059 49	147.711 7	49.237 22	385.429 05
C	3	2.92	4.51	0.110 2	0.036 72	25.571 20	1.150 4	0.383 47	3.001 82
D	3	2.92	4.51	0.168 2	0.056 06	39.044 18	2.098 7	0.699 58	5.476 34
误差	30			0.043 08	0.001 44		3.832 40	0.127 75	
总和				1.709 29			271.360 00		

从表 10 方差分析中还可以看出, 无论是菌丝体培养还是产孢培养研究中, 碳源、氮源还有 MgSO₄ · 7H₂O 因素的 F 值均大于 4.51 ($F_{0.01}$), 说明它们对 Ma₇₈₉ 液体振荡培养影响均达到极显著水平, 而 KH₂PO₄ 因素在菌丝体培养研究中的 F 值为 25.571, 大于 4.51, 故其对液体培养 Ma₇₈₉ 菌丝体影响达到极显著水平, 但在产孢研究中, KH₂PO₄ 的 F 值为 3.002 大于 2.92 ($F_{0.05}$) 却小于 4.51 ($F_{0.01}$), 这说明 KH₂PO₄ 对 Ma₇₈₉ 产孢影响达到显著水平但未达到极显著水平。

3 小结与讨论

绿僵菌在多种农林害虫的生物防治中都取得了明显成效, 作为最常用的菌剂形式分生孢子, 在生产过程、剂型加工或贮存运输时, 经常会遇到瞬间或持续高温, 在一定程度上造成孢子损伤或致死, 但损伤程度或致死率并不明确。研究分生孢子对高温的耐受力, 对于指导生产过程、剂型加工或贮存运输中的温度控制, 以及选择适宜菌株用于相应防治区域和抓住施菌时机等具有重要意义。本文研究了绿僵菌

3 菌株经不同温度水浴处理后孢子萌发情况, 结果显示耐高温较强的是 Ma_{42} 、 Ma_{788} , 而 Ma_{789} 耐高温性相对较差。

由绿僵菌 3 菌株室内毒力测定结果可知, Ma_{789} 对松褐天牛成虫毒力相对较强, 其 LC_{50} 为 9.7×10^5 个 $\cdot mL^{-1}$, 可以初步判断将其作为真菌生物防治松褐天牛的生产菌株, 至于其孢子在野外宿存及其对靶虫的毒力情况有待进一步试验研究。

目前对绿僵菌的研究以液体发酵方法较多, 液体深层培养具有生产周期短, 生产率高, 培养参数易控制等优点, 倍受人们所推崇。本文通过正交试验, 筛选出了液体振荡培养 Ma_{789} 的最优配方。前人对绿僵菌的液体培养已做了大量的研究。樊美珍等^[9]发现绿僵菌的某些菌株在液体深层培养中能产生液生分生孢子, 且有研究认为在某些培养条件下产生的液生分生孢子的性质与气生分生孢子相似。宋漳^[6]对 9 株绿僵菌液体振荡培养的研究表明, 不同氮源和菌株对菌丝生长量和液生孢子产孢量影响显著, 某些绿僵菌菌株可以微循环产孢形式直接产生液生分生孢子, 但微循环产孢现象发生与否可能与菌株有一定的相关性。宋漳等^[10]研究还发现, 金龟子绿僵菌液生分生孢子的形成与培养基组成密切相关, 不同的碳、氮源对液生分生孢子形成具有显著影响, 蔗糖是液体深层培养液生分生孢子的理想碳源, 而花生饼粉、豆饼粉则是较理想的氮源, 且液生分生孢子的产量与培养基氮源的性质有关, 复杂的氮源比简单的氮源更有利于液生分生孢子的形成。本文

的研究结果与他们的研究是相符的。

干菌丝也是真菌杀虫剂的一种剂型, 其为液体发酵产物的应用提供了新的应用空间, 本试验仅研究了液体培养 Ma_{789} 菌丝体的最优配方, 对其液体发酵产物的利用以后将作进一步的研究。

参考文献:

- [1] 王四宝, 樊美珍, 李增智, 等. 松褐天牛天敌微生物的研究利用进展[J]. 昆虫知识, 2003, 40(4): 299 - 303
- [2] Shimazu M, Sato H. Effects of larval age on mortality of *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae) after application of non-woven fabric strips with *Beauveria bassiana* [J]. Appl Entomol Zool, 2003, 38(1): 1 - 5
- [3] Okitsu M, Kishi Y, Takagi Y. Control of adults of *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae) by application of non-woven fabric strips containing *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on infested tree trunks [J]. J Jpn For Soc, 2000, 82(3): 276 - 280
- [4] 李增智, 樊美珍, 汤 坚. 林用真菌杀虫剂生产工艺及应用技术研究[J]. 安徽农业大学学报, 1996, 23(3): 233 - 238
- [5] 宋 漳, 徐乐勤, 江 涛. 8 株绿僵菌孢子萌发条件及室内侵染马尾松毛虫试验[J]. 浙江林学院学报, 1997, 14(2): 165 - 168
- [6] 宋 漳. 九株绿僵菌液体振荡培养初步研究[J]. 福建林学院学报, 1996, 16(1): 38 - 40
- [7] 唐启义, 冯明光. DPS 数据处理系统 [M]. 北京: 科学出版社, 2007
- [8] 陆建身, 赖 麟. 生物统计学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2003
- [9] 樊美珍, 郭 超, 薛文奇. 金龟子绿僵菌液体深层培养初报 [J]. 中国虫生真菌研究与应用, 1993(3): 146 - 149
- [10] 宋 漳. 金龟子绿僵菌液体深层培养研究 [J]. 热带作物学报, 2002, 23(2): 72 - 76