

植物保护

防治烟草甲白僵菌的仓储应用菌株选育

张晓敏¹, 杨辉¹, 施鸣¹, 胡大鸣¹, 刘爱英², 邹晓^{2,3}

1 贵州中烟工业有限责任公司 贵阳 550002;

2 贵州大学真菌资源研究所 贵阳 550025;

3 贵州省烟草品质研究重点实验室

摘要: 为将白僵菌应用于烟叶储存醇化的仓储环境, 对其进行抗干旱、耐高温菌株选育。通过温度筛选获得能够在 35℃ 下生长的球孢白僵菌 GZUIFR-GL5 菌株。该菌株通过紫外线和微波在 150s 下的组合诱变和 PEG 胁迫筛选, 得到具有生长稳定且能够耐受 -0.8Mpa 的较低水势和 35℃ 环境条件的突变菌株 GZUIFR-GL5-08i。测定 GZUIFR-GL5-08i 部分生理指标发现蛋白含量、脯氨酸、SOD、CAT、POD 等含量均比诱变前菌株提高, 反映了在抗旱机理方面虫生真菌与植物抗逆机理有相似性。

关键词: 仓储害虫; 烟草甲; 白僵菌; 抗旱机理

引用本文: 张晓敏, 杨辉, 施鸣, 等. 防治烟草甲白僵菌的仓储应用菌株选育 [J]. 中国烟草学报, 2015, 21 (2)

烟叶在储藏期间会面临多种虫害的危害^[1], 对烟叶危害性最严重的两种害虫为烟草甲 (*Lasioderma serricorne* Fabricius) 和烟草粉螟 (*Ephestia elutella* Hubner)^[2]。由于烟叶调拨流通频繁, 检疫控制措施不是十分有效, 储烟害虫的分布区域正逐年扩大, 严重影响了卷烟品质^[3]。此外, 烟叶等级越高, 虫害越严重; 烟叶储存期越长, 虫损越严重^[4]。据报道我国储存烟叶的直接虫损率为 1.64%^[5]。目前控制烟草甲最为常规的做法是化学熏蒸, 效果虽然显著但对操作人员 and 环境的危害也十分突出, 因此开发新的安全防护技术迫在眉睫。2007 年我国全面禁止了甲胺磷等 5 种高毒农药的生产、销售, 这反映了国家未来的政策导向^[6]。这些变化说明国家政策和烟草产业形势迫使烟草行业向安全、有机、生态方向发展。

在仓储害虫烟草甲的防治技术中生物防治领域虽

一直受到关注, 但是在微生物防治领域的研究文献一直较少, 除一些采用苏云金芽孢杆菌 (BT) 的应用研究外^[7-8], 其它微生物防治技术鲜有报道, 特别是昆虫在自然界最主要的微生物天敌 - 虫生真菌。虫生真菌不仅对人畜及作物无害, 其寄主不易产生抗性, 具有显著的形成流行病能力和生产便利等优点^[9], 且虫生真菌制剂安全, 与环境相容性好^[10]。国内率先筛选了烟草甲成虫的致病真菌^[11], 也有学者测试了白僵菌对烟草甲幼虫的毒力效果^[12]。以上研究结果若要应用于烟仓均不太可能实现。主要问题是仓储环境 (湿度 RH < 75%; 温度 T > 32℃) 湿度过低温度过高, 有研究者将烟草甲的性引诱剂和白僵菌菌粉一起使用并在进行保湿, 该方法对烟草甲取得较好的防治效果。但要实际在仓库中使用, 选育出耐高温、耐低湿的菌株仍然是重要的途径^[13], 具有重要意义。

表 1 供试菌株信息

Tab. 1 Information of experimental strains

菌种名称 Species	菌株编号 Strain	来源与寄主 Source and Host
球孢白僵菌 <i>Beauveria bassiana</i>	GZUIFR-GL5	广西桂林茶场鞘翅目昆虫
球孢白僵菌 <i>B. bassiana</i>	GZUIFR-KBJ	韩国首尔龙头山螳螂
球孢白僵菌 <i>B. bassiana</i>	GZUIFR-2111	来自韩国延世大学寄主不详
布氏白僵菌 <i>B. brongniartii</i>	GZUIFR-6851	贵阳磊庄黑莓生产基地的蛴螬

基金项目: 贵州中烟工业有限责任公司计划项目 (黔烟工计: 200907; 201021) ; 贵州省烟草公司科技项目 (黔烟科合: 200921)

作者简介: 张晓敏 (1965—), 农艺师, Email: zhangxm1983@126.com

通讯作者: 邹晓 (1977—), Email: coprinus@126.com

收稿日期: 2014-02-12

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试菌株在贵州大学真菌资源研究所 (GZUIFR) 和贵州中烟工业有限责任公司技术中心均有保藏备份。见表 1。

1.2 培养基

沙氏培养基: 葡萄糖 20g, 麦芽糖 5g, 蛋白胨 10g, 酵母膏 5g, 琼脂 20g, 水 1000mL。

查氏培养基: NaNO_3 2g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1g, KCL 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, 蔗糖 30g, 琼脂 20g, 水 1000mL, pH 自然。

1.3 温度筛选

将活化好的供试菌株, 接种到沙氏和查氏的平板 ($\Phi 90\text{mm}$) 中, 在生态培养箱 (宁波东南仪器) $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 下培养 14d, 每个处理设 3 个重复。测量菌落直径, 取平均值后用小数值作为参照指标。

1.4 诱变方法

1) 紫外诱变: 取直径 90mm 无菌平皿, 加入浓度为 1.0×10^7 个/mL 孢子悬液 1mL 和搅拌棒, 在 15W 紫外灯的 30cm 处分别搅拌照射 30s, 60s, 90s, 120s, 150s, 180s。盖上皿盖, 关闭紫外灯。将不同照射时间的菌液 0.1mL 涂布平板, 用黑色袋子包裹培养 7 天^[14]。2) 微波诱变: 采用频率为 2450MHz 功率 800W 的微波炉进行微波辐照诱变, 将紫外线 150s 诱变处理后成活菌落培养的菌株, 用含 0.5% Tween-80 的无菌水洗下菌体, 在无菌培养皿中加入 1mL 菌悬液, 进行微波处理。每次辐照 30s 后使平皿

冷却, 再进行照射, 并将照射时间累计^[15]。以辐射时间为微波处理剂量指标, 相同条件非辐射菌悬液的培养平板作为对照, 计算致死率。以致死率超过 90% 的紫外线诱变剂量 150s 处理菌悬液, 再经微波辐射 150s 后涂布在沙氏培养基上, 置于 $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养 7d, 挑取长得好的菌落于 25%PEG6000 的沙氏培养基中培养, 以菌落直径作为复筛标准。

$$\text{致死率} = \frac{\text{对照菌落数} - \text{处理菌落数}}{\text{对照菌落数}} \times 100$$

1.5 生长稳定突变株的验证

将复筛获得的正突变菌株在沙氏培养基上 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 连续传代 8 次, 每次传代后接入含 25% PEG6000 的沙氏培养基 100 mL, $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 培养 10d 洗滤去除培养基后测定菌丝体干重。

1.6 耐高温干旱突变菌株的生理指标检测

蛋白含量测定用考马斯亮蓝 G250 染色法测定; 茚三酮显色法测定脯氨酸含量; SOD 酶活力采用氮蓝四唑法测定; POD 酶测定采用愈创木酚法; CAT 酶的测定光密度法^[16]。

2 结果与分析

2.1 温度筛选试验

经过温度筛选得到来自广西的白僵菌菌株能够耐受较高的环境温度, 虫生真菌最适生长温度一般为 30°C 以下。国内也有研究者筛选到能够在 35°C 下正常生长产孢的罕见耐热的白僵菌菌株^[17]。说明虫生真菌在自然界还是存在合适的耐热菌株需要去筛选。

表 2 菌株在 2 种培养基上 3 个温度梯度下培养 14d 时的生长速度

Tab. 2 Growth velocity of strains cultured on two different media at three different temperatures after 14d

菌株 Strain	种名 Species	沙氏培养基上菌落直径 (Sabouraud colony diameter)/mm			查氏培养基上菌落直径 (Capeck colony diameter)/mm		
		25℃	30℃	35℃	25℃	30℃	35℃
GZUIFR-GL5	球孢白僵菌	70	69	12	52	46	10
GZUIFR-KBJ	球孢白僵菌	60	51	0	58	44	0
GZUIFR-2111	球孢白僵菌	58	58	0	47	51	0
GZUIFR-6851	布氏白僵菌	68	65	8	52	43	5

2.2 紫外和微波诱变 GZUIFR-GL5 孢子的致死率

根据 2.1 结果选择 GZUIFR-GL5 球孢白僵菌为初始菌株进行诱变, 紫外线和微波在 150s 辐照处理, 致死率分别达到 91.8% 和 92.4%, 在 180s 时两种处理方式的死亡率都接近 100%, 说明 GL5 球孢白僵菌对紫外光和微波敏感, 致死效应明显。根据诱变机理, 当致死率 >90% 时较易引起有效突变, 选用 150s 作为紫外照射和微波辐射的诱变剂量。经紫外和微波复

合诱变筛选得 1 株白僵菌, 可以在 25% PEG6000 的沙氏培养基生长良好, 相当于水势为 -0.8 Mpa^[18], 菌株编号为 GZUIFR-GL5-08i。

2.3 遗传稳定性检测

为了检验突变菌株的遗传稳定性, 观察其传代后胁迫培养的菌丝体生物量。从表 3 中可以看出菌丝体生物量基本保持稳定, 说明诱变结果较好。

表 3 紫外与微波诱变处理的致死率
Tab. 3 Lethal rate of UV and microwave radiation mutagenesis

项目 Item	紫外处理时间 /s						微波处理时间 /s					
	30	60	90	120	150	180	60	90	120	150	180	
致死率 (Lethal rate)/%	35.4	59.6	70.5	82.7	91.8	100	66.2	73.5	81.8	92.4	100	

表 4 GZUIFR-GL5-08i 遗传稳定性检测
Tab. 4 Determination of genetic stability for GZUIFR-GL5-08i

项目	传代次数 passage number							
	1	2	3	4	5	6	7	8
生物量 (Biomass) /mg	852±65	879±98	756±75	823±68	728±75	764±88	782±53	722±67

2.4 相关抗性理化指标分析

2.4.1 PEG 干旱胁迫对白僵菌 GZUIFR-GL5-08i 游离总蛋白的影响

从图 1 中可以看出紫外和微波的复合诱变对菌株造成了一定的影响, 蛋白质含量增加了。以 0% PEG 做对照, 诱变株比原始株高出 5.90%。对于诱变株而言, 蛋白质的含量在 10% PEG 以后就趋于稳定, 原始菌株也具有类似趋势。可能是由于环境的压力, 形成一些在正常状况下没有的应激蛋白^[19], 因此, 白僵菌可能为了适应胁迫环境下多合成一些应激蛋白。PEG 浓度与诱变菌株的蛋白质含量存在显著线性回归关系, 其回归方程: $y=573.4114x+3588.787$ (x 为 PEG 含量, 用小数表示; Y 为蛋白质含量, 单位为 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $R=0.827425$)。

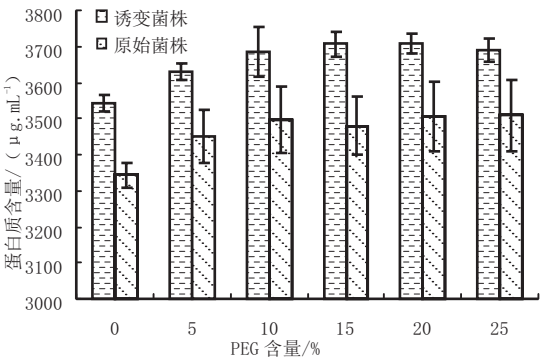


图 1 PEG 干旱胁迫对白僵菌 GZUIFRGL5-08i 游离总蛋白的影响
Fig. 1 Effects of different PEG drought stress on free total protein content of GZUIFRGL5-08i

2.4.2 PEG 干旱胁迫对白僵菌 GZUIFR-GL5-08i 脯氨酸和 SOD 酶的影响

脯氨酸的含量在两株菌中均是先增后降见图 2。诱变菌株在 20% PEG 时达到最高, 为 $281.22 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 比诱变株的 0% PEG 同比高出了 70.19%。不良环境中积累的脯氨酸除了作为细胞质内渗透调

节物质外,还在细胞膜修复、稳定生物大分子结构、胁迫后的修复和生长中作为碳源和氮源以及作为能量库调节细胞氧化还原势等方面起重要作用^[20,21]。诱变菌株的脯氨酸含量在20% PEG 范围内关系显著。其回归方程为: $y=538.7324x+183.5291$ ($R=0.946663$, $F=25.89356$), x 为 PEG 含量,用小数表示; Y 为脯氨酸含量,单位为 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

诱变菌株的 SOD 酶活力与 PEG 含量在 25% 的范围内呈正相关见图 3。超氧化物歧化酶(SOD)在活性氧代谢中处于重要地位,可淬灭 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 启动的一系列自由基连锁反应造成的生物毒性损伤,为生物体内最重要的清除活性氧自由基的抗逆酶类^[16]。国内研究者也发现其它虫生真菌在干旱胁迫时 SOD 酶表达也有很大提高^[22]。该突变菌株的 SOD 酶活在 25% PEG 范围内关系显著。其回归方程为: $y=635.8095x+328.746$ ($R=0.90742$, $F=18.6514$)。 x 为 PEG 含量,用小数表示。 Y 为 SOD 酶活力,单位为 U。

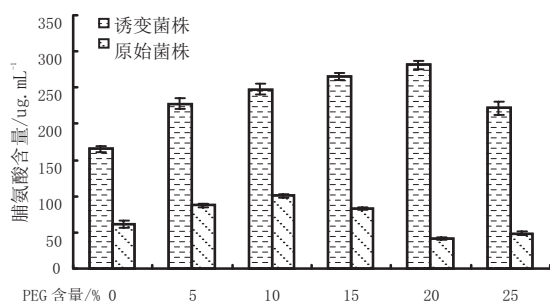


图 2 PEG 干旱胁迫对 GZUIFR-GL5-08i 脯氨酸的影响

Fig. 2 Effects of different PEG drought stress on proline content of GZUIFR-GL5-08i

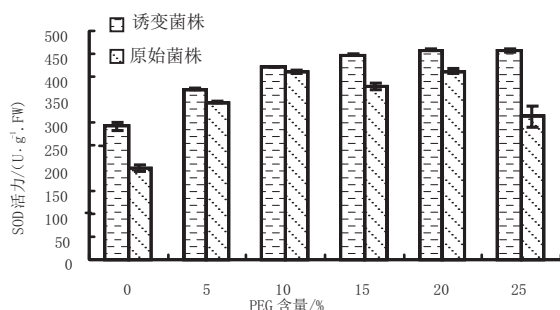


图 3 PEG 干旱胁迫对 GZUIFR-GL5-08i SOD 酶的影响

Fig. 3 Effects of different PEG drought stress on SOD activity of GZUIFR-GL5-08i

2.4.3 PEG 干旱胁迫对菌株 GZUIFR-GL5-08i POD 和 CAT 酶的影响

无论是原始菌株还是突变菌株 POD 的酶活力,

都在上升到 10% PEG 处后就不再增长。说明 POD 的酶活在 15% PEG 后增加不显著且诱变株的活力整体要高于原始株。POD 酶是以过氧化氢为电子受体催化底物氧化的酶。主要存在于细胞的过氧化物酶体中,以铁卟啉为辅基,可催化过氧化氢氧化酚类和胺类化合物,具有消除过氧化氢和酚类、胺类毒性的双重作用。因此它的含量增加有助于菌株提升抗旱性能。经过线性回归分析:诱变菌株的 POD 酶活力与 PEG 含量在 25% 的范围内线性回归关系显著。其回归方程为: $y=335.4666x+222.1222$ ($R=0.823628$, $F=8.436406$)。 x 为 PEG 含量,用小数表示。 Y 为 POD 酶活力,单位为 U。

CAT 的酶活力随 PEG 浓度上升呈现出高斯曲线形状。诱变菌株在 15% PEG 处达到高峰(94.7U),原始菌株在 10% PEG 处达高峰(68.71U)。诱变过后,CAT 的酶活耐受干旱胁迫的强度略高于原始菌株,且 CAT 整体的酶活要高于原始株。CAT 酶是可促使 H_2O_2 分解为分子氧和水,清除体内的过氧化氢,从而使细胞免于遭受 H_2O_2 的毒害,是生物防御体系的关键酶之一。因此它的含量增加有助于菌株提升抗旱性能。

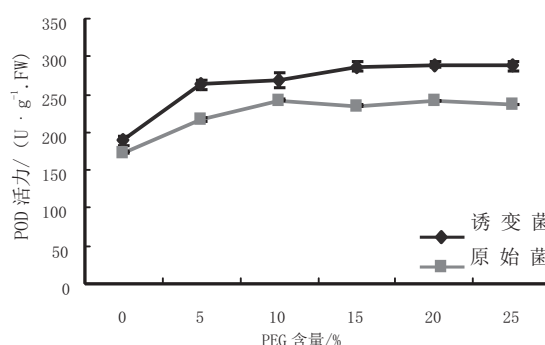


图 4 PEG 胁迫对 GZUIFR-GL5-08i POD 酶的影响

Fig. 4 Effects of PEG stress on POD activity of GZUIFR-GL5-08i

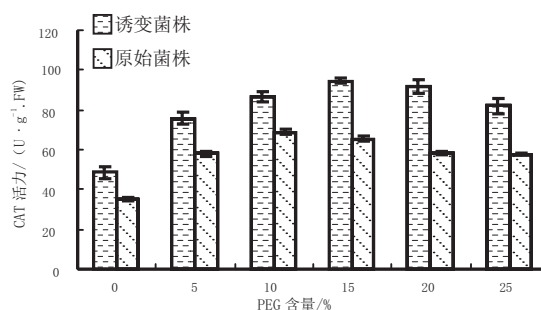


图 5 PEG 胁迫对 GZUIFR-GL5-08i CAT 酶的影响

Fig. 5 Effects of PEG stress on POD activity of GZUIFR-GL5-08i

3 讨论

烟叶仓储环境一直是虫生真菌控虫应用的禁区,对于烟叶而言储存醇化增质是首要目标,但是也要保证防虫、控霉的前提。控制霉菌就要求环境要低湿度,而虫生真菌产生防治效果往往需要较高的环境湿度,这就造成了菌株自身生理特点与实际环境的矛盾。解决这个问题,一方面利用菌种选育技术获得能够适应仓储环境并能发挥作用的菌株。同时也可考虑在仓储大环境下建立局部高湿的小环境将烟草甲虫吸引过来进行防治^[13],该方法的问题是防治规模较小。另外烟草甲一旦爆发很难根治,其中一个重要原因就是其扩散到了醇化库不易杀虫的小环境和仓库周围的大环境。在防治时出于成本考虑,往往都是密封垛小环境杀虫而忽略周围环境的虫口减少。利用虫生真菌防治烟叶仓储周围环境也是一个值得尝试的技术手段。

4 结论

通过文中的结果可以看出,白僵菌的抗性机理与植物类似,在植物中其重要作用的抗逆酶类和脯氨酸在白僵菌中也与抗旱能力相关性密切。这些生理指标可以做为虫生真菌抗逆性菌株初步筛选和评估作参考。另外在自然界中还有许多待开发的虫生真菌生物资源,由于虫生真菌生活史中生殖方式的复杂性,导致同一个种内的不同来源菌株之间差异显著,这也为菌株资源的筛选提供了更广阔的途径。

参考文献

- [1] 胡涌,高念昭. 贵州烟仓害虫天敌种类及优势天敌初步研究[J]. 植物保护, 2006, 32(3): 81-84.
- [2] 蒋樟法. 烟叶仓储害虫及检疫措施[J]. 植物检疫, 2001, 15(3): 181-182.
- [3] 张小霞,梁振普,邱立友,等. 烟仓害虫的生物防治[J]. 中国农学通报, 2007, 23(2): 379-383.
- [4] 汤朝起,张俊,陆益敏. 烟草甲和烟草粉螟的防治研究[J]. 中国烟草科学, 2000, 21(4): 46-48.
- [5] 李志强,钟俊鸿,陈越立,等. 我国储烟烟草甲和霉菌的发生现状与治理对策[J]. 广东农业科学, 2009(12): 110-115.
- [6] 曾智,孙运军,钱荣华,等. 我国微生物农药的研究应用现状与前景[J]. 农业现代化研究, 2008, 29(2): 254-256.
- [7] 齐绪峰,宋纪真,谢剑平. 贮烟仓库中苏云金芽孢杆菌对烟草甲的杀灭活性[J]. 烟草科技, 2006(5): 186-188.
- [8] 崔莹莹,席宇,杨艳坤,等. 一株对烟草甲高毒力的苏云金芽孢杆菌的分离与鉴定[J]. 化学与生物工程, 2009(5): 309-310.
- [9] 李文华,张永军,王中康. 虫生真菌穿透昆虫表皮相关理化因子的研究[A]. 昆虫与环境—中国昆虫学会 2001 年学术年会[C], 2001, 473-479.
- [10] 王慧芳,张颖,孙晓红. 未来农药的发展趋势[J]. 天津化工, 2005, 19(4): 13-16.
- [11] 刘爱英,邹晓,胡海燕,等. 烟草甲致病真菌的初步筛选[J]. 中国生物防治, 2008, 24(2): 186-188.
- [12] 朱元,方力,陈斌. 球孢白僵菌对烟草甲幼虫的毒力测定[J]. 云南农业大学学报, 2009, 24(1): 42-46.
- [13] 邹晓,罗力,张晓敏,等. 性引诱剂与白僵菌联合使用防治烟草甲虫效果[J]. 植物保护, 2010(4): 60-62.
- [14] 沈萍,范秀容,李广武. 微生物学实验(第三版)[M]. 北京:高等教育出版社, 2005.
- [15] 李豪,车振明. 微波诱变微生物育种的研究[J]. 山西食品工业, 2005, (2): 5-14.
- [16] 张志良,瞿伟箐. 植物生理学实验指导(第三版)[M]. 北京:高等教育出版社, 2003.
- [17] 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(2): 278-283.
- [18] 杨敏生,斐宝华,于冬梅. 水分胁迫对毛白杨杂种无性系苗木维持膨压和渗透能力的影响[J]. 生态学报, 1997, 17(4): 364-370.
- [19] Smith H, Michael H. 微生物蛋白质组学[M]. 北京:化学工业出版社, 2009: 63-129.
- [20] Jain M, Mathur G, Koul S, Sarin N B. Ameliorative effects of proline on salt stress induced lipid peroxidation in cell lines of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. Plant Cell Rep, 2001(20): 463-468.
- [21] Hefnawy M A, Nasr M I, Mongy M E L. Growth and Soluble Amino Acid Composition in *Penicillium corylophilum* and *Halobacterium halobium* Grown Under Salt Stress[J]. Folia Microbiol, 1999, 44(1): 25-31.
- [22] 胡海燕,邹晓,王鹏霞,等. 干旱胁迫对蝉拟青霉 SOD 活性的影响[J]. 菌物研究, 2008, 6(1): 54-56.

Screening and breeding of *Beauveria bassiana* for controlling tobacco beetles

ZHANG Xiaomin¹, YANG Hui¹, SHI Ming¹, HU Daming¹, LIU Aiyang², ZOU Xiao^{2,3}

1 China Tobacco Guizhou Industrial CO., LTD. Guiyang, 550000, China;

2 Institute of Fungus Resources, Guizhou University, Guiyang, 550025, China;

3 Guizhou Key Laboratory for Tobacco Quality Research, Guiyang, 550025, China

Abstract: Screening and breeding of drought-resistant and high temperature-resistant *Beauveria bassiana* was conducted so as to make it adaptable in leaf tobacco warehouse. GZUIFR-GL5-08i strains were screened out through a combined ultraviolet and microwave mutagenic experiment. Results showed that GZUIFR-GL5-08i sustained stable growth on the condition of water potential 0.8Mpa and temperature 35 °C. Content of protein, proline, SOD, CAT, POD were higher than that before mutation, which showed similarity in draught-resistance mechanism between entomogenous fungi and plants.

Keyword: pests in stored products; tobacco beetle; *Beauveria bassiana*; resistance mechanism

Citation: ZHANG Xiaomin, YANG Hui, SHI Ming, et al. Screening and breeding of *Beauveria bassiana* for controlling tobacco beetles [J]. Acta Tabacaria Sinica, 2015, 21(2)

◇ 相关论文推荐

白僵菌对烟草粉蛾及烟草甲的致病性研究

【作者】 刘爱英; 罗力; 邹晓; 胡海燕; 张晓敏; 杨辉; 吴让新

【机构】 贵州大学真菌资源研究所; 贵州中烟工业公司

【摘要】 为进一步研究白僵菌对烟叶仓储害虫的控制作用,将 4×10^{10} 个孢子/g 白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 孢子粉喷施于有害虫的烟叶上,几天后在 5 m 距离处设置的空白检测箱中亦检测到感染真菌而死亡的储烟害虫。表明,感染带菌的害虫能自由迁飞。经显微镜检结果证实,白僵菌粉对烟草粉蛾和烟草甲均具有较强的致病力,在处理 21 d 后死亡率分别达 31% 和 84.4%。

【关键词】 烟草粉蛾; 烟草甲; 球孢白僵菌; 迁飞; 致病性

摘自《贵州农业科学》2009 年 09 期