DOI:10.16423/j.cnki.1003-8701.1979.01.007

白僵菌菌种选育的研究

宋明芝* 张淑兰 相连英 王辉先 杨敏芝 徐庆丰

（吉林省农业科学院植物保护研究所）

田洪彦

（科右前旗胡力吐公社微生物农药厂）

白僵菌防治玉米螟在我省已推广多年，效果良好。随着近年来使用面积的不断扩大和群众性土法生产白僵菌农药的迅速发展，生产上使用菌种数量越来越多。同时也反映出繁殖的菌种易于退化的问题。为了进一步推动这一事业的发展，选育出生产稳定、抗逆性强、致病力高的新菌株，已成为当前生产上迫切需要解决的问题。

用强烈因素诱变微生物菌种，在发酵工业上已获得了良好的效果，但是应用于嗜虫性真菌的选育，到目前为止还仅有少数报导。 也夫拉霍娃等（ЕВлахова 1963、1966）最早应用物理学和化学等方法诱变白僵菌种，获得了一些致病力强的新菌株［8］［9］，国内广东、福建、江西、安徽等省林业科研及教学单位，也曾采用自然僵虫分离及幅射处理等技术，选育出抗逆性强、致病力高的松毛虫白僵菌新菌株〔5〕〔6〕，为了提高白僵菌防治玉米螟的作用和达到稳定生产的要求，我们于1976—1977年开展了玉米螟白僵菌选育的研究，取得初步结果，现整理作一初步报导。

一、实验途径及方法

本项工作主要采取自然僵虫的分离筛选和应用物理及化学诱变剂处理两种途径。

（一）自然僵虫的分离筛选

将采自省内各地的自然感染白僵病的玉米螟幼虫， 用0.1%升汞酒精（50%酒精液）浸泡3分钟， 无菌水洗二次，分段放于查氏培养基的平板上， 于24—25°C 恒温箱中培养5—7天，待虫体上长出菌丝及孢子后，转接于马铃薯蛋白胨斜面上保存，供试验用。

（二）钴60照射及亚硝基胍诱变剂处理

1、菌悬液的制备：钴60照射用灭菌的生理食盐水（0.85%氯化钠溶液），亚硝基胍诱变用灭菌的磷酸缓冲液（pH6）刮洗斜面培养基上的孢子， 倒入灭菌过的盛有玻璃球的三角瓶中，充分振荡分散孢子后， 用灭菌的脱脂棉过滤， 测定孢子量（血球计数板直测），并稀释至10^6孢子／毫升的浓度。

---

*现在土肥所微生物室

2、处理剂量：钴$_{60}$照射剂量为1万、5万、10万、15万、20万伦琴六个处理。亚硝基胍处理浓度为0.1、0.3、0.5、1.0及2.0毫克／毫升。于28°C中保温30分钟。

3、平板分离和成活率计算：每处理各取3个稀释度，每次取0.1毫升，涂抹于查氏培养基平板上，于24—25°C温箱中培养，调查菌落数，以未处理的对照菌落数为基数，计算孢子成活率。

（三）筛选方法

1、先从斜面培养基上连续传代三次，比较菌株生长势和再生菌丝的生长情况，按下列标准进行初选。

优良菌株：生长快，菌层厚，产孢量多，再生菌丝出现少。

劣势菌株：生长缓慢，菌层薄，产孢量少，再生菌丝形成多。

2、麦麸培养基孢子数测定：将不同菌株用麦麸培养基（麦麸80%、稻壳20%、加水量为干料的80%）进行定温培养（24—25°C），形成孢子后，取定量麦麸培养基加水稀释，用血球计数板计数，并算出每克麦麸中所含的孢子数。

3、室内毒力测定：用玉米螟幼虫作为生测对象。采用两种方法进行测定。一是将菌种配成每毫升含40万孢子的悬液，将玉米螟幼虫逐个在定量孢子液中蘸一下，按失去水量计算出每头幼虫体沾有白僵菌孢子数（4666个孢子／头）。每处理30头幼虫。将处理的幼虫放入切成12—14厘米长挖有洞穴的玉米秆中，玉米秆放入玻璃缸内，缸口用一层湿布，外加六层纱布包扎。于室温下（18—21°C）进行饲养，定期调查幼虫寄生率。

第二种方法与上述方法大致相同。即将配成每克为5亿的沙子颗粒剂（与田间使用的颗粒剂浓度相仿），撒在玻璃皿中，使供试幼虫逐个在颗粒剂上翻滚一下，按上法算出每头幼虫上所沾的孢子数（223万孢子／头）。最后也放于玻璃缸内的玉米秆中，于室温下（19—22°C）进行饲养，定期调查幼虫寄生率。

4、田间效果鉴定：按一般田间颗粒剂治螟方法［4］配制每克含白僵菌孢子为10亿及1亿两种浓度的颗粒剂。每株玉米心叶中撒颗粒剂量为0.5克。

二、试验结果及分析

（一）自然僵虫的分离及筛选

自省内各地采集玉米螟自然僵虫共计76头，从中分离出70个白僵菌菌株。用斜面培养基繁殖三代，从中观察各菌株生长情况，再生菌株丝出现的多少。初筛出4、9、18、32、35、46、51、57号8个较好的菌株。

根据上述初选的菌株，用麦麸培养基进行培养，用血球计数板直测孢子数，结果见表1。

孢子数测定结果：7个菌株高于对照菌株，1个菌株低于对照菌株，其中以9号菌株产孢子数最高，比对照菌株高63.7%。其次为57、51、46、18、35、4号等菌株，高于对照16.0—49.7%，32号菌株则低于对照9.3%。

根据以上筛选结果，再选出4号、9号、18号三个菌株进行室内毒力测定，结果见表2。

表 1　　不同菌株在麦麸培养基上的产孢量

菌　株	孢　子　数（亿／克）				
	1	2	3	平　均	%
CK	116	146	88	116.7	100
4	134	140.2	142	135.4	116.0
9	195	191	186	190.7	163.4
18	166.8	140	128	144.9	124.2
32	93.5	120.6	103.3	105.8	90.7
35	129	127.8	162.5	139.8	119.8
46	152	166.5	136.2	151.6	129.9
51	176	162	169.5	169.2	144.8
57	168.3	233.3	122.5	174.7	149.7

表 2　　玉米螟僵虫分离菌株室内毒力测定

菌株	第一次毒力测定（9月11日—9月25日）		第二次毒力测定（9月24日—10月5日）			
	僵　虫（%）		僵　虫（%）			
	11天	14天	5天	7天	9天	11天
对　照	16.6	33.3	16.6	30.0	60.0	80.0
4	19.7	33.3	10.0	26.6	70.0	86.7
9	48.1	77.8	16.6	36.6	70.0	83.3
18	29.6	77.8	16.6	33.3	70.0	86.7
空　白	0	7.4	0	0	0	3.6

参加毒力测定的4号、9号、18号三个菌株，9号及18号菌株的二次测定结果都高于对照菌株。第一次比对照高34.5%，第二次比对照高33%和6.7%。在第一次毒力测定中，由于所用的白僵菌孢子浓度较小（每头幼虫体沾孢子数为4666个），玉米螟幼虫死亡慢，菌株间毒力差异较大。第二次毒力测定中，所用白僵菌孢子浓度大（每头幼虫沾孢子数为233万个），幼虫死亡快，菌株间毒力差异小。但经14天以后，除对照菌株和9号菌株各有一头活虫外，其余各菌株处理的幼虫全部死亡。

通过以上三种筛选步骤，初步确定9号及18号为优良菌株。

（二）钴60诱变及单孢分离

出发菌株：1976年3月分离的对照菌株。

菌龄：马铃薯蛋白胨斜面培养基培养7天，培养温度为24—25°C。

通过钴$_{60}$照射，察氏培养基稀释平板培养后调查菌落数，计算孢子存活率，结果见表3。

一万伦琴处理菌落形态变化不大，少数有变异，随着钴$_{60}$剂量的增大，菌落的形态发生明显的变异，处理的菌落多数生长缓慢，孢子量减少。

表3　　　　钴60处理白僵菌存活率

处　理	稀释倍数孢子／／毫升	菌落数				活孢子数／毫升	存活率%
		1	2	3	平　均		
CK	10^4	100	108	101	103	1030000	100
1万伦琴	10^4	73	61	65	66	660000	64.08
5万伦琴	10^3	63	86	97	82	82000	7.96
10万伦琴	10	72	98	70	80	800	0.078
15万伦琴	10	8	3	0	3.7	37	0.0036
20万伦琴	10	3	0	4	2.3	23	0.0022

由出发菌株的平板单孢菌落中选出A－1、A－2、A－3三个菌株孢子形成早，产孢量较多。由钴$_{60}$1万伦琴、5万伦琴和10万伦琴处理中选出B_1～B_{10}十个菌株，其孢子层形成较厚，产孢量亦多（表4）。

表4　　　　钴60诱变及平板分离白僵菌株菌落孢子特征

菌株号	菌落孢子特征	钴60照射剂量
A－1	菌落生长快，孢子层厚	—
A－2	〃　〃	—
A－3	〃　〃	—
B－1	菌落生长较快，孢子层较厚	1万伦琴
B－2	菌落生长较快，孢子层较厚	〃
B－3	〃　〃	〃
B－4	菌落不扩展，隆起状，孢子层较厚	5万伦琴
B－5	〃　〃　〃	〃
B－6	孢子变暗黄色，孢子层较薄	10万伦琴
B－7	菌落生长较慢，孢子层较厚	5万伦琴
B－8	〃　〃	〃
B－9	菌落生长较慢，孢子层较厚	10万伦琴
B－10	〃　〃	〃

将以上13个菌株按上述四个程序筛选，从斜面传代中选出A－3、B－3、B－4三个菌株。第二个程序麦麸培养基培养后的孢子数测定结果列于表5。

表5　　　　白僵菌菌株在麦麸培养基上的孢子数测定

菌株号	处　理	孢子数（亿／克）				
		1	2	3	平　均	%
CK		116	146	88	116.7	100
A－3	单孢分离	187	147	102	146	125.1
B－3	钴60一万伦琴	115.7	134	95	114.9	98.5
B－4	钴60五万伦琴	171.2	120.5	119	136.9	117.3

由表5结果看出，A—3高于对照25.1%，B—4高于对照17.3%，而B—3低于对照1.5%。

第三个程序的室内毒力测定结果列于表6。

表6　　白僵菌钴60诱变菌株室内毒力测定

菌株号	第一次毒力测定（9月11日—9月25日）		第二次毒力测定（9月24日—10月5日）			
	僵虫（%）		僵虫（%）			
	11天	14天	5天	7天	9天	11天
对　照	16.7	33.3	16.7	30.0	60.0	80.0
A—3	42.9	85.7	13.3	33.3	70.0	90.0
B—3	64.3	89.3	17.8	35.7	82.1	92.9
B—4	42.3	84.6	23.3	46.7	86.6	93.3
空　白	0	7.7	0	0	0	3.6

由表6结果看出，第一次毒力测定A—3、B—3、B—4、三个菌株高于对照52.4%、56.0%、51.3%。第二次毒力测定高于对照10%、12.9%、13.3%。

从单孢分离及钴60诱变菌种中，根据前三项指标，初步选出A—3、B—3、B—4三株优良菌株。

（三）亚硝基胍诱变选育

出发菌株：Ⅰ、1976年原出发菌株。

Ⅱ、钴60诱变菌株B—4。

菌龄：8天

用不同浓度亚硝基胍诱变剂处理，经查氏培养基稀释平板培养，调查菌落数，计算孢子存活率，结果见表7。

表7　　亚硝基胍诱变白僵菌存活率

处　理	白僵菌孢子存活率%	
	原出发菌株	B—4
出发菌株	100	100
0.1毫克／毫升	94.67	64.52
0.3毫克／毫升	26.53	13.87
0.5毫克／毫升	14.93	11.07
1毫克／毫升	1.47	1.51
2毫克／毫升	0.13	0.11

0.1毫克／毫升浓度处理后的孢子死亡率低，菌落形态变化小，处理浓度愈大，孢子死亡率愈高，菌苔生长愈缓慢，孢子形成愈少。从各处理中挑选C—1至C—14十四个菌株，及BC—1至BC—6个菌株，其孢子层较厚，孢子较多（表8）。

表 8 **亚硝基胍诱变白僵菌菌株菌落孢子特征**

菌株号	菌 落 孢 子 特 征	亚硝基胍处理浓度
C—1	菌落较厚，孢子层蓬松	0.1毫克／毫升
C—2	〃 〃	〃
C—3	孢子较厚	〃
C—4	菌落扩展少，孢子层较厚	0.3毫克／毫升
C—5	〃 〃	〃
C—6	孢子层较紧密	〃
C—7	孢子色白，较厚	〃
C—8	孢子色黄，较厚	0.5毫克／毫升
C—9	〃 〃	〃
C—10	孢子色淡黄，菌落小	〃
C—11	孢子较厚	〃
C—12	孢子色黄，较厚	〃
C—13	〃 〃	〃
C—14	〃 〃	〃
BC—1	菌落中部突起很小，孢子色黄，较厚	0.1毫克／毫升
BC—2	孢子色黄，蓬松	〃
BC—3	〃 紧密	0.3毫克／毫升
BC—4	〃 〃	〃
BC—5	菌落中部突起很少，较厚	0.5毫克／毫升
BC—6	孢子色黄，较厚	〃

通过上述筛选程序，从斜面传代选出C—3、C—6、C—7、C—9、C—10、BC—2、BC—4等七个菌株。用麦麸培养基培养，进行孢子数测定，结果列于表9。

表 9 **白僵菌菌株在麦麸培养基上的孢子数测定**

菌株号	亚硝基胍处理浓度	孢子数（亿／克）				
		1	2	3	平 均	%
出发菌株		155.8	166.2	160.0	160.7	100
C—3	0.1mg／ml	177.8	167.0	160.8	168.5	104.85
C—6	0.3mg／ml	158.8	153.0	190.6	167.5	104.23
C—7	0.3mg／ml	145.8	168.8	107.0	140.9	87.68
C—9	0.5mg／ml	156.0	123.2	163.2	146.0	92.10
C—10	0.5mg／ml	168.6	153.8	148.6	156.7	97.51
B—4		167.6	165.8	181.8	171.1	100
BC—2	0.1mg／ml	169.8	181.2	183.2	174.7	102.10
BC—4	0.3mg／ml	176.2	198.6	198.8	191.2	111.75

由表9结果着出，C—3、C—6二株菌株产孢量分别高于出发菌株4.85%，4.23%。BC—2、BC—4二株菌株分别高于对照B—4菌株2.10%、11.75%。

室内毒力测定结果列于表10。

表10　　白僵菌亚硝基胍诱变菌株毒力测定

菌　株	僵　虫（%）			
	11天	13天	16天	19天
对　照	3.7	18.5	33.3	59.3
C—3	0	41.6	54.2	79.2
C—6	0	13.7	41.4	70.0
C—7	6.7	20.0	23.3	48.2
C—9	0	6.7	23.3	46.7
C—10	0	6.6	23.3	57.2
B—4	0	6.6	33.3	70.0
BC—2	0	6.6	14.3	35.7
BC—4	0	21.1	51.7	79.3
空　白	0	0	0	3.5

由表10结果看出，室内菌株毒力测定，C—3、C—6分别高于出发菌株19.9%、

表11　　白僵菌菌种田间毒力测定（科右前旗呼力吐公社新起微生物厂）

菌株号	每株苞米施用白僵菌孢子数	防治日期	调查株数	折杆株数	折蓼株数	蛀孔株数	被害株数	被害率%	防治效果%	毒力%
空　白			200	5	3	17	25	12.5		
出发菌株	0.5亿	7月10日	〃	1	6	12	19	9.5	24.8	100
9	〃	〃	〃		6	8	14	7	44.4	179.1
18	〃	〃	〃	2	1	7	10	5	60.0	241.6
A—3	〃	〃	〃	1	3	9	13	6.5	48.0	193.5
B—3	〃	〃	〃	3	8	4	15	7.5	40.0	161.2
B—4	〃	〃	〃	1	5	5	11	5.5	56.0	225.7
C—3	〃	〃	〃	3		3	6	3	76.0	306.4
BC—4	〃	〃	〃	1	4	5	10	5	60.0	282.2
9	5亿	〃	〃		1	2	3	1.5	88.0	104.8
18	〃	〃	〃	1			1	0.5	96.0	114.3
A—3	〃	〃	〃		3		3	1.5	88.0	104.8
B—3	〃	〃	〃	1	1	1	3	1.5	88.0	104.8
B—4	〃	〃	〃			10	10	5	60.0	71.4
C—3	〃	〃	〃		1	3	4	2	84.0	100.0
BC—4	〃	〃	〃			2	2	1	92.0	109.5
出发菌株	〃	〃	〃	1	1	2	4	2	84.0	100.0

10.7%，BC—4高于B—4菌株9.3%。这次试验所用玉米螟是越冬幼虫，较前二次试验所用秋季幼虫死亡慢。

从亚硝基胍诱变菌种中，通过斜面传代、麦麸培养基孢子数测定、室内菌种毒力测定等三个程序筛选，初步选出C—3、BC—4二株优良菌株。

（四）筛选菌株田间治螟效果鉴定

将1979年及1977年二年用僵虫分离、钴60照射、亚硝基胍诱变等方法选的七个优良菌株（9、18、A—3、B—3、B—4、C—3、BC—4等）进行了田间治螟试验。试验系采用一般颗粒剂治螟法，每克颗粒剂中含孢子量10亿及1亿两种浓度，每株玉米心叶中撒颗粒剂量为0.5克，结果见表11。

从以上结果着出，使用0.5亿个白僵菌孢子的颗粒剂，菌株间效果差别很大，筛选出的7个菌株防治效果均比对照株高，其中以C—3、BC—4及18号三个菌株最为突出，分别高于对照206.4%、182.2%及114.6%。使用浓度为5亿孢子／克的颗粒剂，菌株间治螟效果差异较小，只有和18号菌株较好，高于对照菌株14.3%。

三、总结及讨论

通过二年来对自然僵虫分离、钴60照射及亚硝基胍诱变等途径，从103株白僵菌菌株中选育出18号、9号、C—3、及BC—4四个优良菌株。这些菌株表现生长快、产孢多，毒力强等优点。经两年来在生产上应用证明其生产稳定，治虫效果高。

实践证明，微生物选育是当前提高菌种优势、达到优质、高产的有效途径之一。从生物学特性的观点出发，用物理和化学诱变剂诱导真菌的变异和产生新品系，已是当前微生物育种上的重要课题。然而，在选育高效微生物品种时，虽可采用多种途径，因其对象及选育要求各异，而其选育方法亦各不相同。就白僵菌选育工作来说，不少作者曾采用钴60、X光射线及D·D·T、林丹等处理方法均已取得一定的效果〔5〕〔6〕〔8〕〔9〕。有人认为，超声波及紫外线处理白僵菌是无效的〔7〕。本试验结果表明，采用钴60及亚硝基胍处理均获得较好的结果，而从自然僵虫分离筛选新菌株，则仍然是一个可取的途径。另外，要选育一个优良菌株必须具备那些标准，这与应用的对象有所不同。一般说来，对于选育嗜虫性真菌的对象，作者认为应根据其长势（或繁殖率），产孢量（或产毒素）以及致病性三个标准来衡量，由此而采取斜面传代观察生长势，麦麸培养基培养测定产孢量以及室内或田间重复试验其毒力的方法和步骤，以确定出一个高效菌株，本试验结果为此目的提供了依据，可供从事这方面工作的参考。但应当指出，目前所采用的筛选方法还比较繁锁，有必要研究简化其生物测定方法，确定一种简易、快速的毒效测定的标志物，以便与当前大力发展的群众性选育工作相适应。另外，还需要加强白僵菌遗传规律的研究，因为这不仅对提高嗜虫性微生物的研究水平具有意义，而且对提高当前生产，推动治虫工作的开展将起着重大作用。

参 考 文 献

1、李钟庆、方心芳　1958　紫外光线及芥子气处理黑曲霉引起变异的试验　微生物

学报 6（3）：321—327

2、檀耀辉等 1965 用紫外线及氮芥诱变黑曲霉的研究，微生物学报 11（2）195—200

3、吴甫中等 1965 紫外线诱发白地霉（Geotrichum Candidum）变异的研究，微生物学报11（2）：202—208。

4、徐庆丰等 1973 应用白僵菌防治玉米螟的田间试验，昆虫学报，16（2）：203—206

5、江西省森林病虫防治站 1975 白僵菌诱变育种简报，微生物通报，2（2）：10—11

6、安徽省当涂县白僵菌厂等 1977 白僵菌耐低湿菌株的选育，微生物通报，3（3）：5—6。

7、K.Aizawa、1971 Strain improvement and preservation of virulence of pathogens: Microbial control of insect and mites 655—677

8、А.А. Евлахова иО. Швецова 1963 Отбор вирулентных форм микроорганизмов В испоользованиях микробиологбиескому методу боръбы с вредными Насэко ми, В кн. микробиологическому Метоh, боръьы с вредными насекомыми. Москва. стр. 24—33

9、Евлахова А.А 1966, Экспериментальное повышение вирулентности энтомопатологенных грибов путем Воздействия химическцми И Физическими факторами, тр Моск. Обин Испыт. прир.257—262