

## 研究报告

# 响应面设计优化莱氏绿僵菌 SZCY 固体发酵培养条件及致病力测定

薛锐, 付玉飞, 杨光源, 彭跃进, 杜广祖\*, 陈斌\*

云南农业大学植物保护学院 云南生物资源保护与利用国家重点实验室, 云南 昆明 650201

薛锐, 付玉飞, 杨光源, 彭跃进, 杜广祖, 陈斌. 响应面设计优化莱氏绿僵菌 SZCY 固体发酵培养条件及致病力测定[J]. 微生物学通报, 2023, 50(2): 514-525.

XUE Rui, FU Yufei, YANG Guangyuan, PENG Yuejin, DU Guangzu, CHEN Bin. Optimization of the solid-state fermentation conditions of *Metarhizium rileyi* SZCY by response surface methodology and determination of the virulence[J]. Microbiology China, 2023, 50(2): 514-525.

**摘要:**【背景】莱氏绿僵菌(*Metarhizium rileyi*)对新入侵我国的草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)具有较强的致病力和田间流行性, 因此具备深入开发的價值。【目的】优化莱氏绿僵菌 SZCY 固态发酵培养条件, 测定所产分生孢子对草地贪夜蛾幼虫的毒力, 为提高该菌株分生孢子规模化生产奠定基础。【方法】采用单因素试验确定了相对适宜的固态培养基, 利用 Box-Behnken 响应面法优化该菌株的固态培养基和发酵参数, 同时评价不同条件下该菌所产分生孢子对草地贪夜蛾幼虫的毒力。【结果】去颖稻谷(rice)为莱氏绿僵菌 SZCY 菌株固相产孢最佳载体。培养温度、光周期及酵母浸粉含量是影响莱氏绿僵菌 SZCY 固态发酵产孢量的主要因素。莱氏绿僵菌 SZCY 固态发酵最佳工艺参数为温度 22.83 °C、光周期 18.68 h L:5.32 h D、酵母浸粉 4.98 g/100 g, 在此条件下, 莱氏绿僵菌在去颖稻谷固态培养基上的产孢量为  $5.65 \times 10^{10}$  孢子/g, 用其制备浓度为  $10^7$  孢子/mL 的孢子悬浮液, 对草地贪夜蛾 3 龄幼虫的  $LT_{50}$  为 3.88 d。【结论】害虫生防真菌莱氏绿僵菌 SZCY 菌株以去颖稻谷为固态培养基的发酵培养条件, 该条件下产孢量大且对草地贪夜蛾幼虫毒力强, 具有广阔的开发应用前景。

**关键词:** 莱氏绿僵菌; 响应面法; 固体发酵; 分生孢子产量; 毒力

资助项目: 云南省重大科技专项(2019ZG00902)

This work was supported by the Science and Technology Key Special Project of Yunnan Province (2019ZG00902).

\*Corresponding authors. E-mail: DU Guangzu, duguangzu1986@163.com; CHEN Bin, chbins@163.com

Received: 2022-05-13; Accepted: 2022-07-25; Published online: 2022-08-31

## Optimization of the solid-state fermentation conditions of *Metarhizium rileyi* SZCY by response surface methodology and determination of the virulence

XUE Rui, FU Yufei, YANG Guangyuan, PENG Yuejin, DU Guangzu\*, CHEN Bin\*

State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan, College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, Yunnan, China

**Abstract: [Background]** The insect-pathogenic *Metarhizium rileyi* shows promising potential for controlling the virulent exotic *Spodoptera frugiperda* which infests crops, particularly maize. Thus, this fungal species should be further developed. **[Objective]** To optimize the solid-state fermentation conditions of *M. rileyi* SZCY, determine the virulence of the yielded conidia to *S. frugiperda*, and thus lay a basis for the large-scale production of the conidia. **[Methods]** The single-factor experiment and Box-Behnken design were used to optimize the solid-state fermentation medium factors and fermentation parameters. The virulence of the conidia yielded under different conditions to the 3rd instar larvae of *S. frugiperda* was evaluated. **[Results]** Husked rice was the best fermentation medium for SZCY, as the conidium yield was the highest. The culture temperature, photoperiod, and content of yeast extract powder were the main factors affecting the sporulation of SZCY in solid-state fermentation. The optimal fermentation parameters for solid-state fermentation are as follows: culture temperature of 22.83 °C, photoperiod 18.68 h L:5.32 h D, and yeast extract powder of 4.98 g/100 g. Under these conditions, the conidium production of SZCY on husked rice was  $5.65 \times 10^{10}$  conidia/g and the  $LT_{50}$  of the suspension ( $10^7$  conidia/mL) for the 3rd instar larvae of *S. frugiperda* was 3.88 days. **[Conclusion]** The optimal medium for solid-state fermentation of SZCY was husked rice. With this medium and the optimal fermentation parameters, the conidium yield was higher and the yielded conidia show strong virulence to *S. frugiperda*. Therefore, SZCY should be further developed for biocontrol.

**Keywords:** *Metarhizium rileyi*; response surface methodology; solid-state fermentation; conidium yield; virulence

莱氏绿僵菌(*Metarhizium rileyi*), 旧称莱氏野村菌[*Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson], 也称莱氏蛾霉或绿色穗霉<sup>[1-3]</sup>, 是一种重要的昆虫病原真菌, 可寄生多种昆虫, 如斜纹夜蛾(*Spodoptera litura*)、银纹夜蛾(*Argyrogramma agnata*)和甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)等, 尤其对夜蛾科类害虫具有较强的致病作用, 是当前国内外研究和应用最多的虫生真菌之一<sup>[4]</sup>。该真菌分生孢子

附着于寄主昆虫体表, 萌发产生芽管穿透昆虫体壁进入体腔引起昆虫死亡。因其致病作用强且能引起害虫流行病, 可在短期内有效遏制害虫种群数量的增加, 将害虫种群数量控制在经济阈值之下, 所以其具备良好的开发潜力及市场应用前景。草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)自 2019 年在云南省普洱市江城玉玉米田首次被发现以来, 已在我国 20 多个省(自治区/直辖

市)发现, 并已成为影响我国玉米产量的重要因素, 我国每年因草地贪夜蛾危害经济作物所造成的损失可达 100 亿元人民币<sup>[5-7]</sup>。

目前市场上尚未见有莱氏绿僵菌制剂, 其主要原因是在传统虫生真菌培养条件下该菌生长缓慢、产孢量较低<sup>[8]</sup>。莱氏绿僵菌的毒力与分生孢子的质量紧密相关, 分生孢子质量的高低受发酵条件和发酵技术的影响<sup>[9]</sup>。此外, 产孢量是筛选高质量生物防治菌株的重要依据之一<sup>[10]</sup>。因此, 优化发酵培养条件对筛选有生防潜力的菌株显得尤为重要。在实际生产中, 莱氏绿僵菌分生孢子制剂主要是通过液体发酵、固体发酵和液-固双相发酵技术来获得, 目前多通过液-固双相发酵技术进行规模化生产, 该技术充分结合液体深层发酵和固体发酵的优势, 除了成本低廉、操作技术简单外, 还保持了菌丝体的自然生长状态<sup>[11-12]</sup>。利用液-固双相发酵技术不仅可以减少污染, 还能大幅度缩短发酵周期<sup>[13-16]</sup>, 但当前主要是通过优化固体发酵培养基成分来提升莱氏绿僵菌分生孢子的产量与质量<sup>[12,17-18]</sup>。然而, 除固体培养基成分外, 影响昆虫病原真菌固态发酵的因素还有培养温度、光周期、接种量等<sup>[12]</sup>。因此, 探究莱氏绿僵菌固态发酵过程中适宜的内部营养因子、外界环境因子及内外各项因子间的交互作用十分必要。

现代数学中的统计优化技术已逐步广泛应用于优化微生物培养工业<sup>[19-21]</sup>。其中, 响应面法因其可以模拟出连续的三维变量曲面模型, 并且可以分析出影响微生物生长各项因素间的交互作用, 已成为优化微生物培养工艺中常见的方法之一<sup>[22]</sup>。Bhanu 等<sup>[23]</sup>利用响应面法以每克基质产孢量作为响应值, 优化出适宜金龟子绿僵菌生长的固态培养基; 张婧迪等<sup>[11]</sup>应用响应面设计法优化建立了有利于提升金龟子绿僵菌分生孢子产量及质量的固态培养基。由此,

利用响应面法建立数学模型对昆虫病原真菌固态发酵培养条件优化具有良好的可行性。

本研究利用前期所筛选的最适液态发酵条件, 获得了莱氏绿僵菌 SZCY200812 的高质量发酵液。测定不同固态培养基底物对菌株产孢量、分生孢子萌发及含水量的影响, 然后采用 Plackett-Burman 试验对培养菌株的温度、光周期、接种量、稻壳配比、酵母浸粉含量、麦芽糖含量、无机盐类助剂和发酵时间等因素进行测定, 筛选影响该真菌固态发酵产孢的主要因素, 再采用最陡爬坡试验寻找响应面试验的中心点, 通过响应面法模拟建立三位变量曲面的固态发酵模型优化得到最佳固态发酵条件。最后, 通过测定各处理莱氏绿僵菌所产分生孢子对草地贪夜蛾 3 龄幼虫的毒力, 进而评估固态发酵生产分生孢子质量及发酵培养效果。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

供试菌株为本实验室分离纯化的莱氏绿僵菌 SZCY200812 菌株, 该菌株分离自云南省曲靖市师宗县彩云镇玉米田(104°5'3"N, 24°29'25"E, 海拔 1 341 m)罹病草地贪夜蛾幼虫。

供试培养基为 SMAY 培养基<sup>[24]</sup>。

供试培养液为 SDY 培养液<sup>[24]</sup>。

供试固态培养基<sup>[25]</sup>: 去颖稻谷固态培养基为去颖稻谷 100.0 g, 植物调和油 5.0 mL; 稻谷固态培养基为稻谷粒 100.0 g, 植物调和油 5.0 mL; 玉米粒固态培养基为玉米粒 100.0 g, 植物调和油 5.0 mL; 大豆固态培养基为大豆 100.0 g, 植物调和油 5.0 mL。

麦芽糖、葡萄糖、蛋白胨、酵母浸粉等试剂, 国药集团化学试剂有限公司。恒温摇床, 上海知楚仪器有限公司; 立式压力蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; 超清工作台, 苏州安泰

空气技术有限公司; 光照培养箱, 广州恒立实验室设备科技有限公司。

## 1.2 菌株的培养与保存

采用划线法将莱氏绿僵菌 SZCY200812 菌株接种至 SMAY 培养基, 25 °C、全光照 3 000 lx 培养箱中倒置培养 5 d。菌种的保存采用低温干燥法将菌株孢子与无菌沙土充分混匀, 并置于 -80 °C 条件下保存<sup>[26]</sup>。

## 1.3 固液态培养基的制备与筛选

液态培养基制备: 依照 1.1 配制培养液, 调整初始 pH 值为 6.7, 经 101 kPa 高压蒸汽灭菌 15 min 后备用。

发酵液制备: 将接种于培养基上的莱氏绿僵菌 SZCY 菌株置于 25 °C、全光照 3 000 lx 的培养箱中倒置培养 7 d 后, 取长势良好的莱氏绿僵菌分生孢子, 转至盛有 101 mL SDY 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中(终浓度为  $10^7$  CFU/mL), 24.8 °C、181 r/min 全光照 3 000 lx 条件下培养 5 d 后备用。

固态培养基制备: 称取固态培养基原料, 浸泡 12 h 后沥去多余水分。然后量取相应体积的植物调和油, 置于灭菌袋中充分混匀后, 于 101 kPa 灭菌 30 min, 冷却至室温后备用<sup>[25]</sup>。

固态发酵制备: 待制备固态培养基其冷却至室温后, 按 0.5 mL/g 的比例接入发酵液, 充分混匀后转入灭菌后的浅盘内, 置于(25±1) °C, 湿度为(75±5)%, 全光照条件下培养, 定期观察其生长情况。待菌株生长 15 d 后收集分生孢子粉, 依据对分生孢子各项指标的测定结果利用方差分析对其质量进行评估, 以筛选出最佳固态发酵培养基, 重复 5 次<sup>[27]</sup>。

## 1.4 Plackett-Burman 试验设计

采用 Plackett-Burman (PB) 设计对温度( $X_1$ )、光周期( $X_2$ )、接种量( $X_3$ )、稻壳配比( $X_4$ )、酵母浸粉含量( $X_5$ )、麦芽糖含量( $X_6$ )、无机盐类助剂

( $X_7$ )和发酵时间( $X_8$ )等因素进行筛选。选取  $N=12$  的试验设计, 对培养条件进行两水平因子的设计: 高水平为“1”(范围区间最大值)以及低水平为“-1”(范围区间最小值), 并以每克基质产孢量作为响应值( $Y$ ), 剩余变量用于估计试验误差<sup>[28]</sup>, 得出主要影响产孢量的因素。

## 1.5 最陡爬坡试验设计

根据 Plackett-Burman 所得的影响显著培养质量的因素, 设计最优的步长和爬坡方向, 其他因子的浓度为初始添加浓度, 试验重复 3 次取平均值, 以此找到响应面试验的中心点<sup>[29]</sup>。

## 1.6 响应面法优化发酵因素

根据最陡爬坡试验设计所得响应中心点, 设计响应面分析试验<sup>[30-31]</sup>, 利用 Design-Expert 对试验结果进行分析, 得出各变量和响应值之间关系的多项回归模型方程。多项回归模型方程为:  $Y=b_0+\sum b_i x_i+\sum b_{ij} x_i x_j+\sum b_{ii} x_i^2$  式中,  $Y$  为响应值;  $b_0$  为常数项;  $b_i$  为一次项回归系数;  $b_{ij}$  是交互项回归系数;  $b_{ii}$  是平方项回归系数。

## 1.7 验证试验

将经响应面法计算所得出的最适培养条件进行固态发酵试验验证, 重复 5 次, 用原培养条件作为对照, 定时观察生长情况将收集到不同培养时间的分生孢子依据质量指标进行测定, 比较二者间差异。

## 1.8 分生孢子产量和质量的测定

产孢量: 称取所收集到的分生孢子粉 1.0 g, 装入盛有 100.0 mL 的 0.01% Tween-80 无菌水锥形瓶内, 于 25 °C、200 r/min 振荡 30 min。利用血球计数板在光学显微镜下观察并计数, 依据公式计算每克孢子粉中的分生孢子数量<sup>[32]</sup>。

分生孢子含水量测定: 称取 0.3 g 分生孢子粉于直径 50 mm 的铝制称量盒内, 置于 120 °C 干燥箱内烘干至恒重。冷却至室温后称重, 两

者之差即分生孢子含水量<sup>[33]</sup>。

分生孢子萌发率测定: 将分生孢子粉转入上述培养液中, 置于温度为(25±1) °C、转速 180 r/min、全光照摇床上, 培养 120 h, 用血球计数板观察各处理分生孢子的萌发率, 每个处理重复 5 次, 每个重复观察 200 个分生孢子<sup>[27]</sup>。

分生孢子毒力测定: 采用浸虫法对 3 龄草地贪夜蛾幼虫进行毒力测定。首先, 将固态发酵培养所得分生孢子粉置于 0.05% Tween-80 无菌水中, 制备浓度为 10<sup>7</sup> CFU/mL 的分生孢子菌悬液。其次, 取供试昆虫, 在上述制备好的菌悬液中浸渍 10 s, 用灭菌滤纸吸干虫体多余菌悬液后, 移至皿底垫有湿润滤纸片的培养皿 ( $d=6$  cm) 中单头饲养, 皿内放入新鲜玉米叶供其取食, 以 0.05% Tween-80 无菌水作为空白对照。每处理设 3 组重复, 每组重复接种 30 头 3 龄幼虫。将处理后的幼虫置于(25±1) °C, 相对湿度(75±5)%, 光周期 14 h L:10 h D 的人工气候箱中单头饲养, 24 h 后记录死亡虫数, 采用 Probit 方法计算致死中时  $LT_{50}$  值<sup>[5]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同固态培养基对莱氏绿僵菌 SZCY 产孢质量的影响

由表 1 可知, 莱氏绿僵菌 SZCY 在 4 种固

态培养基上于 25 °C 全光照条件下均能生长, 但产孢量、萌发率及孢子含水量之间存在差异。其中, 在去颖稻谷固态培养基上, 莱氏绿僵菌的每克基质产孢量最高达到  $8.04 \times 10^9$  CFU/g, 极显著高于其他处理 ( $P < 0.01$ ); 而且所产分生孢子含水量最低, 仅为 4.20%。玉米粒固态培养基所产气生分生孢子每克基质产粉量、每克基质产孢量及第 120 h 累计萌发率均极显著低于其余处理 ( $P < 0.01$ )。

### 2.2 Plackett-Burman 试验确定影响固态发酵产孢量培养条件重要因素

表 2 为 Plackett-Burman 试验结果, 以莱氏绿僵菌每克基质产孢量作为响应值 ( $Y$ ), 对数据进行回归分析得出关于响应值多元一次回归方程:  $Y = 1.39 \times 10^9 - 9.75 \times 10^8 A - 5.58 \times 10^8 B + 2.88 \times 10^8 C - 2.18 \times 10^8 D - 1.99 \times 10^8 E - 7.51 \times 10^8 F + 7.39 \times 10^7 G$ , 决定系数  $R^2 = 0.9291$ 。

使用 Design-Expert 14.0 软件对表 2 进行数据分析后得到表 3。由表 3 可知, 7 项试验变量影响顺序由大到小依次为: 培养温度、酵母浸粉含量、光周期、接种量、麦芽糖含量、稻壳配比和发酵时间, 其中培养温度为极显著影响因素。  $P < 0.05$  表示该变量为显著因素, 在 7 项试验变量中, 外界环境温度、酵母浸粉含量、光周期为构建模型的主要影响因子。

表 1 不同培养基对莱氏绿僵菌 SZCY 产孢质量的影响

Table 1 Effect of solid medium on the quality of sporulation of *Metarhizium rileyi*

SZCY 固态培养基	每克基质含孢量	萌发率	孢子含水量
SZCY solid medium	Number of conidia ( $\times 10^9$ CFU/g)	Germination rate (%)	Water content (%)
黄豆 Soy bean	4.33±0.12b	87.22±2.19bc	8.91±0.24a
去颖稻谷 Rice	8.04±0.22a	99.56±0.44a	3.36±0.09c
玉米粒 Corn grain	2.44±0.17c	80.73±3.43c	4.20±0.12b
稻谷 Rough rice	4.90±0.25b	93.13±0.86ab	3.53±0.18bc
	$F=141.36, P<0.01$	$F=14.85, P<0.01$	$F=245.10, P<0.01$

数据为平均数±标准误。数据后小写字母表示差异达 1% 显著水平

Data are mean±standard error. Data followed by different lowercase letters indicate significant difference at 0.01 level.

表 2 PB 试验设计的变量与水平取值及试验结果

Table 2 The variations and levels of Plackett-Burman design and its result

试验 序号 Test No.	试验因素 Experimental factors							每克基质 产孢量 Spore yield ( $\times 10^9$ CFU/g)
	温度 Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	光周期 Photoperiod (h)	接种量 Inoculation amount	麦芽糖含量 Carbon source	稻壳配比 Rice husk ratio	酵母浸粉含量 Nitrogen source	发酵时间 Fermentation time	
1	1	1	1	-1	-1	1	-1	4.11
2	-1	1	1	-1	1	-1	1	29.71
3	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	41.00
4	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	14.45
5	1	-1	1	1	1	-1	-1	13.55
6	-1	1	-1	1	1	1	1	8.27
7	-1	1	1	1	-1	1	-1	6.28
8	1	-1	1	-1	1	1	1	4.79
9	1	1	-1	1	1	-1	-1	0.12
10	-1	-1	1	1	-1	-1	1	42.79
11	1	-1	-1	1	-1	1	1	0.96
12	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1.84

表 3 方差分析表

Table 3 ANOVA of Plackett-Burman design

Source	Sum of squares	df	Mean square	F value	P value
Model	$2.400 \times 10^{19}$	7	$3.429 \times 10^{18}$	7.470	0.035 2
A Temperature	$1.140 \times 10^{19}$	1	$1.140 \times 10^{19}$	24.840	0.007 6
B Photoperiod	$3.740 \times 10^{18}$	1	$3.740 \times 10^{18}$	8.150	0.046 1
C Inoculation amount	$9.932 \times 10^{17}$	1	$9.932 \times 10^{17}$	2.160	0.215 2
D Carbon source	$5.699 \times 10^{17}$	1	$5.699 \times 10^{17}$	1.240	0.327 5
E Rice husk ratio	$4.784 \times 10^{17}$	1	$4.784 \times 10^{17}$	1.040	0.364 9
F Nitrogen source	$6.760 \times 10^{18}$	1	$6.760 \times 10^{18}$	14.730	0.018 5
G Fermentation time	$6.559 \times 10^{16}$	1	$6.559 \times 10^{16}$	0.143	0.724 5
Residual	$1.835 \times 10^{18}$	4	$4.588 \times 10^{17}$		
Cor total	$2.584 \times 10^{19}$	11			

### 2.3 不同固态发酵培养条件响应中心点确定

根据回归方程  $Y=1.397 \times 10^9 - 9.745 \times 10^8 A - 5.583 \times 10^8 B + 2.877 \times 10^8 C - 2.179 \times 10^8 D - 1.997 \times 10^8 E - 7.505 \times 10^8 F + 7.393 \times 10^7 G$  可知, 培养温度、酵母浸粉含量、光周期因素在方程中系数为负数, 表明在该模型中存在负效应, 最陡爬坡试验需对其参数进行降低; 由表 4 可知, 试验 3 处理组每克基质产孢量最高, 因此利用该组数据

参数作为响应面设计中心点。

### 2.4 响应面试验设计及结果分析

根据最陡爬坡试验确定响应中心点(表 5), 并拟合建立描述响应值( $Y$ )与自变量间关系的多项式模型, 借助 Design-Expert 13.0 对表 6 中的数据进行多元回归分析, 得出莱氏绿僵菌 SZCY 固态发酵每克基质产孢量( $Y$ )与自变量  $A$  (温度)、自变量  $B$  (光周期)及自变量  $C$  (酵母浸粉含量)

表 4 最陡爬坡设计试验结果

Table 4 Results of the steepest ascent design experiment

No.	温度 Temperature (°C)	光周期 Photoperiod (h)	酵母浸粉 含量 Nitrogen source	产孢量 Spore yield ( $\times 10^{10}$ CFU/g)
1	17	24	7	0.37
2	20	22	6	2.68
3	23	20	5	4.01
4	26	18	4	3.92
5	29	16	3	0.03

表 5 响应面试验因素与水平

Table 5 Factors and levels of response surface experiment

水平 Level	A 温度 Temperature (°C)	B 光照周期 Photoperiod (h)	C 酵母浸粉含量 Nitrogen source (%)
-1	20	12	3
0	23	18	5
1	25	24	7

表 6 响应面试验设计与试验结果

Table 6 Design and results of response surface experiment

Run	A 温度 Temperature (°C)	B 光照时长 Photoperiod (h)	C 酵母浸 粉含量 Nitrogen source (%)	Y 产孢量 Spore yield ( $\times 10^{10}$ CFU/g)
1	20	24	5	0.81
2	26	12	5	0.04
3	26	18	7	0.29
4	23	18	5	5.08
5	23	18	5	4.89
6	26	18	3	0.34
7	23	24	7	2.68
8	23	12	7	1.67
9	23	12	3	1.31
10	23	18	5	5.22
11	23	18	5	5.65
12	20	18	3	1.08
13	23	18	5	5.17
14	20	12	5	0.66
15	23	24	3	3.07
16	20	18	7	1.11
17	26	24	5	0.11

的回归方程为:  $Y=5.20-0.36A+0.3737B-0.0063C-0.02AB-0.02AC-0.1875BC-0.032BD-3.14A^2-1.66B^2-1.36C^2$ 。

根据上述所建立的回归方程描述响应值(Y)与各因素间的关系时,全体自变量与因变量间存在的线性关系显著,该多项式模型拟合方程  $R^2=0.9838$ , 决定系数在校正后  $R^2_{adj}=0.9630$ , 表明所建立多项式模型方程可信度高,预测值与实际值拟合度好,而且根据方差分析结果显示该模型显著( $P<0.001$ ),同时失拟项 $>0.05$ 说明模型失拟项不显著。因此,该回归方程为莱氏绿僵菌 SZCY 菌株最适固态发酵提供了适宜的模型。对所建模型回归系数进行方差分析,发现莱氏绿僵菌液态发酵所设计的 3 项自变量中,二次项都达到极显著水平,说明所设计的自变量均对产孢量的影响较大。

根据 Design-Expert 13.0 所得做出响应面等高线图如图 1 所示,自变量 A、B、C 均存在各自的极值点,根据其极值点可以得到所建曲面模型的最大点,对应 3 个自变量取最优试验点的编码值分别为  $A=-0.057$ 、 $B=0.113$ 、 $C=-0.009$ ,即温度为 22.83 °C、光周期为 18.68 h L:5.32 h D,酵母浸粉含量为 4.98%条件下,莱氏绿僵菌 SZCY 固态发酵于第 10 天,每克基质产孢量最高预测值可达到  $5.23 \times 10^{10}$  CFU/g。

## 2.5 不同处理组固态发酵所产分生孢子对 3 龄草地贪夜蛾幼虫的毒力测定

由表 7 可知,利用不同条件所产分生孢子,配制为同浓度孢子悬浮液接种处理草地贪夜蛾 3 龄幼虫后,对草地贪夜蛾 3 龄幼虫表现出明显的毒力,但致死中时存在一定差异。在 23 °C、18 h L:6 h D、5%酵母浸粉条件下所产孢子致病毒力最强,致死中时最短,仅为 3.74 d;在 26 °C、18 h L:6 h D、7%酵母浸粉条件下所产孢子毒力最弱,致死中时最长,为 5.69 d。

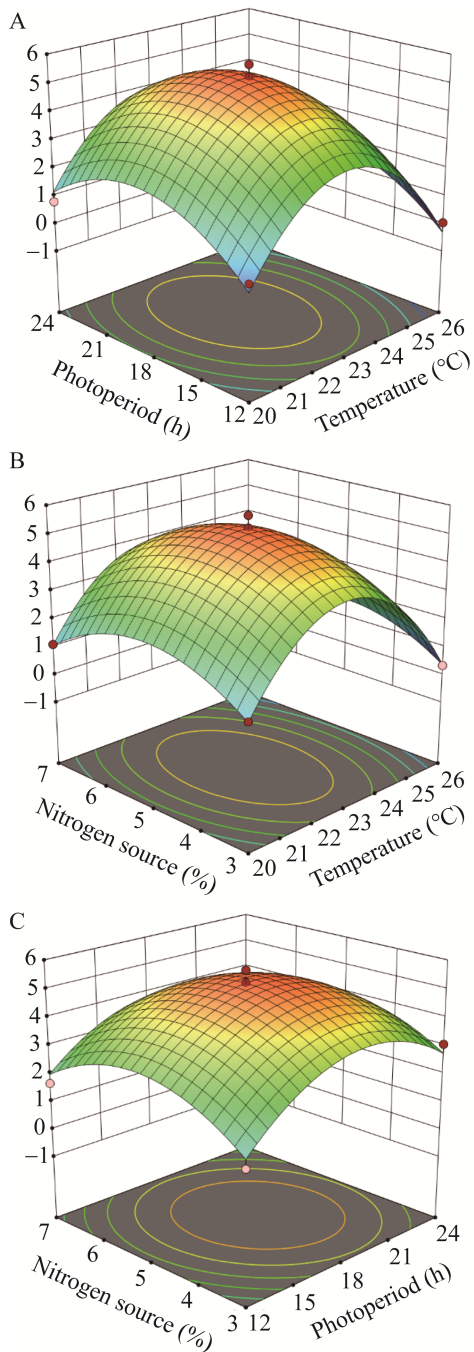


图 1 两因素交互影响产孢量的响应面 A: 光照周期和温度的响应面图. B: 酵母浸粉含量和温度响应面图. C: 酵母浸粉含量和光周期的响应面图  
Figure 1 Response surface of spore output of two-factor interaction. A: Photoperiod and temperature response surface. B: Nitrogen source and temperature response surface. C: Nitrogen source and photoperiod response surface.

表 7 各处理所产分生孢子对 3 龄草地贪夜蛾幼虫毒力测定

Table 7 Toxicity of conidia by each treatment to the 3rd instar larvae of *Spodoptera frugiperda*

处理 Treatment	A 温度 A Temperature (°C)	B 光照周期 B Photoperiod (h)	C 酵母浸粉含量 C Nitrogen source (%)	致死中时 Median lethal time (d)
1	20	24	5	5.21
2	26	12	5	5.45
3	26	18	7	5.69
4	23	18	5	3.85
5	23	18	5	3.74
6	26	18	3	5.34
7	23	24	7	4.59
8	23	12	7	4.75
9	23	12	3	4.83
10	23	18	5	3.54
11	23	18	5	3.77
12	20	18	3	5.58
13	23	18	5	3.89
14	20	12	5	5.21
15	23	24	3	4.16
16	20	18	7	4.74
17	26	24	5	5.35

## 2.6 利用固态发酵验证发酵条件

利用响应面法所得优化固态发酵条件, 利用去颖稻谷固态培养基, 培养温度为 22.8 °C, 光周期为 18.7 h L:5.3 h D, 酵母浸粉含量为 5%, 进行莱氏绿僵菌 SZCY 固体发酵培养, 培养第 10 天时基质产孢量可达到  $5.48 \times 10^{10}$  CFU/g, 此条件下所产分生孢子对草地贪夜蛾 3 龄幼虫致死中时为 3.37 d, 与所建立模型的预测值极为相近。因此, 该模型预测性和可靠性良好, 并且通过优化后固态发酵产孢量是优化前单一固态发酵产孢量的 8 倍, 进而可证明利用响应面优化莱氏绿僵菌固体发酵工艺的可行性。

## 3 讨论与结论

莱氏绿僵菌作为一种重要的害虫生防真菌, 可寄生 200 多种害虫, 尤其对夜蛾科害虫



种群自然控制具有良好作用。莱氏绿僵菌是通过分生孢子附着于昆虫体壁后对目标害虫进行侵染<sup>[34-35]</sup>，因此，提高莱氏绿僵菌的分生孢子产量是生物制剂开发应用的关键。

本研究利用 Plackett-Burman 及 Box-Behnken 中心组合设计方法对草地贪夜蛾具有高毒力的莱氏绿僵菌 SZCY 菌株固态发酵条件进行优化。研究发现，通过 Plackett-Burman 方法确定培养温度、酵母浸粉含量及光周期作为主要影响固态发酵产孢量的因素。通过最陡爬坡试验明确响应面中心点。进一步利用响应面法优化发酵参数过程中发现，上述三因子在不同组合方式下，固态发酵产孢量和所产分生孢子毒力均存在差异。据报道，在固态培养基中加入大豆或去颖壳稻谷可明显提高莱氏绿僵菌产孢量<sup>[12]</sup>。其原因可能是去颖稻谷不仅能够提高固态发酵培养基的表面积并维持培养基湿度，还含有丰富的淀粉、蛋白质和脂肪等物质，从而提供充足营养物质供菌株生长<sup>[36-38]</sup>。在含去颖稻谷的固态培养基中加入食用油后不仅可以防止米粒间粘连，还可以适当补充定量氮源，保证真菌正常生长<sup>[17,39-40]</sup>。据报道，不同含量的外源营养物质会影响昆虫病原真菌的分生孢子毒力、产孢量、贮存时间等<sup>[41-43]</sup>，并且随着外界环境条件和培养基成分的改变，将会影响昆虫病原真菌不同基因型比例的改变，使菌株表现型出现差异<sup>[44-45]</sup>。

分生孢子毒力的强弱是孢子质量的重要评价指标<sup>[12]</sup>。研究发现，利用建模所得理论最佳固态发酵培养条件所产分生孢子毒力和产孢量均为最佳，这与前人发现昆虫病原菌致病力与产孢量成显著正相关的结论<sup>[46]</sup>相一致。Charnley<sup>[47]</sup>研究发现，昆虫病原菌穿透昆虫表皮的过程是由附着孢产生的机械压力及分解体壁物质的分解酶等多因素共同调控。也有研究表明，昆虫

病原真菌毒力与菌株胞外酶活性相关<sup>[48]</sup>。因此该培养条件可诱导莱氏绿僵菌 SZCY 菌株产生更多胞外酶，使其毒力提升。

本研究利用响应面法优化筛选的莱氏绿僵菌固体发酵培养基及培养条件，分生孢子萌发率高，而且对害虫的毒力强，从而解决了莱氏绿僵菌生物制剂开发中优质分子孢子生产的技术瓶颈。通过液-固双相发酵产孢技术能够在更短时间内以低廉的成本将莱氏绿僵菌分生孢子的产量及质量最优化。因此，液-固双相发酵产孢技术不仅为莱氏绿僵菌的分生孢子产量提升提供理论基础，还可为其他与莱氏绿僵菌同类的昆虫病原真菌固相产孢条件提供参考。此外，本研究为生物制剂的开发奠定了一定基础，但未探究利用此培养条件进行继代培养后菌株毒力的稳定性，这将是下一步继续深入探究的重要内容。

## REFERENCES

- [1] KISH LP, SAMSON RA, ALLEN GE. The genus *Nomuraea* Maublanc[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1974, 24(2): 154-158.
- [2] KEPLER RM, HUMBER RA, BISCHOFF JF, REHNER SA. Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics[J]. Mycologia, 2014, 106(4): 811-829.
- [3] 周立峰, 于士军, 刘元兵, 王滨. 莱氏野村菌对夜蛾科害虫防治潜力的室内评测[J]. 中国生物防治学报, 2012, 28(1): 47-52.  
ZHOU LF, YU SJ, LIU YB, WANG B. Laboratory assessment on virulence of *Nomuraea rileyi* against noctuid larvae[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2012, 28(1): 47-52 (in Chinese).
- [4] 蒲蛰龙, 李增智. 昆虫真菌学[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1996.  
PU ZL, LI ZZ. Insect Mycology[M]. Hefei: Anhui Science & Technology Publishing House, 1996 (in Chinese).
- [5] 龙秀珍, 高旭渊, 曾宪儒, 何瞻, 韦德卫, 江小冬, 曾涛, 于永浩. 一株莱氏绿僵菌的筛选及其对草地贪

- 夜蛾的毒力[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(6): 1111-1119.
- LONG XZ, GAO XY, ZENG XR, HE Z, WEI DW, JIANG XD, ZENG T, YU YH. Screening of a *Metarhizium rileyi* strain and its virulences to *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2021, 37(6): 1111-1119 (in Chinese).
- [6] 雷妍圆, 王德森, 薛志洪, 吕利华, 黄少华, 章玉苹. 广州地区一株绿僵菌的鉴定及其对草地贪夜蛾的致病力测定[J]. 南方农业学报, 2020, 51(6): 1265-1273.
- LEI YY, WANG DS, XUE ZH, LV LH, HUANG SH, ZHANG YP. Identification of a *Metarhizium* strain and its pathogenicity to *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Guangzhou area[J]. Journal of Southern Agriculture, 2020, 51(6): 1265-1273 (in Chinese).
- [7] 郑亚强, 胡惠芬, 付玉飞, 金新华, 张栩, 杨宝云, 张志红, 黄明亮, 李永川, 陈斌, 李正跃. 草地贪夜蛾莱氏绿僵菌的分离鉴定[J]. 植物保护, 2019, 45(5): 65-70.
- ZHENG YQ, HU HF, FU YF, JIN XH, ZHANG X, YANG BY, ZHANG ZH, HUANG ML, LI YC, CHEN B, LI ZY. Isolation and identification of entomopathogenic fungi *Metarhizium rileyi* isolated from *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith)[J]. Plant Protection, 2019, 45(5): 65-70 (in Chinese).
- [8] 李学文, 张希鹏, 张蕾蕾, 张悦, 姜晓娇, 林志颖, 刘守柱. 基于 CTAB 的莱氏绿僵菌选择性培养基制备及分离效果研究[J]. 中国植保导刊, 2021, 41(9): 22-29, 61.
- LI XW, ZHANG XP, ZHANG LL, ZHANG Y, JIANG XJ, LIN ZY, LIU SZ. Preparation and isolation effect of selective medium for *Metarhizium rileyi* based on CTAB[J]. China Plant Protection, 2021, 41(9): 22-29, 61 (in Chinese).
- [9] BEHLE RW, JACKSON MA. Effect of fermentation media on the production, efficacy, and storage stability of *Metarhizium brunneum* microsclerotia formulated as a prototype granule[J]. Journal of Economic Entomology, 2014, 107(2): 582-590.
- [10] PENG YJ, DING JL, FENG MG, YING SH. Glc8, a regulator of protein phosphatase type 1, mediates oxidation tolerance, asexual development and virulence in *Beauveria bassiana*, a filamentous entomopathogenic fungus[J]. Current Genetics, 2019, 65(1): 283-291.
- [11] 张婧迪, 蔡明美, 刘志诚, 陈捷. 响应面设计优化绿僵菌固体发酵条件[J]. 微生物学通报, 2016, 43(9): 2072-2078.
- ZHANG JD, CAI MM, LIU ZC, CHEN J. *Metarhizium* solid-state fermentation optimization by response surface analysis[J]. Microbiology China, 2016, 43(9): 2072-2078 (in Chinese).
- [12] 唐维媛, 邢丛丛, 董永刚, 王雪娜, 张义明. 对斜纹夜蛾高致病性莱氏野村菌 Nr19 固体培养条件的优化[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(2): 180-188.
- TANG WY, XING CC, DONG YG, WANG XL, ZHANG YM. Optimization of solid culture conditions for *Nomuraea rileyi* (Nr19) a pathogenic fungus of *Spodoptera litura*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2016, 32(2): 180-188 (in Chinese).
- [13] 牟宏晶, 杨路清, 张辉, 张桂玲. 淡紫拟青霉的固体发酵工艺研究[J]. 化学与粘合, 2008, 30(4): 68-71.
- MU HJ, YANG LQ, ZHANG H, ZHANG GL. The solid fermentation technology of *Paecilomyces lilacinus*[J]. Chemistry and Adhesion, 2008, 30(4): 68-71 (in Chinese).
- [14] 高立红, 江志阳, 尹微. 淡紫拟青霉固体发酵工艺研究[J]. 微生物学杂志, 2020, 40(6): 36-43.
- GAO LH, JIANG ZY, YIN W. Solid fermentation technology of *Paecilomyces lilacinus*[J]. Journal of Microbiology, 2020, 40(6): 36-43 (in Chinese).
- [15] 谢明. 蜡蚧轮枝菌发酵生物学及发酵工程的研究[D]. 北京: 中国农业科学院博士学位论文, 2003.
- XIE M. Fermentation biology and fermentation engineering of *Verticillium lecanii* (zimmerman) viegas[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2003 (in Chinese).
- [16] KANG SW, LEE SH, YOON CS, KIM SW. Conidia production by *Beauveria bassiana* (for the biocontrol of a diamondback moth) during solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor[J]. Biotechnology Letters, 2005, 27(2): 135-139.
- [17] 刘光英. 莱氏野村菌(*Nomuraea rileyi*)的固体发酵及分生孢子活力的研究[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2011.
- LIU GY. Study on solid fermentation and aerial conidial viability of *Nomuraea rileyi* cq strain[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2011 (in Chinese).
- [18] 崔筱. 虫生真菌—莱氏野村菌 Nr1001 菌株的生物学研究与应用[D]. 开封: 河南大学硕士学位论文, 2012.
- CUI X. The biological research and application of one entomogenous fungi: *Nomuraea Rileyi*1001[D]. Kaifeng: Master's Thesis of Henan University, 2012 (in Chinese).

- [19] OSKOUIE SFG, TABANDEH F, YAKHCHALI B, EFTEKHAR F. Response surface optimization of medium composition for alkaline protease production by *Bacillus clausii*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 39(1): 37-42.
- [20] 金城. 响应面模型分析在发酵产酶条件优化中的应用[J]. 微生物学通报, 2014, 41(5): 1010.  
JIN C. Optimization of enzyme production with response surface modeling[J]. Microbiology China, 2014, 41(5): 1010 (in Chinese).
- [21] 王东, 荣家萍, 唐自钟, 布同良, 陈惠. 响应面法优化枯草芽孢杆菌产中性蛋白酶的发酵条件[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(1): 143-151.  
WANG D, RONG JP, TANG ZZ, BU TL, CHEN H. Response surface method optimization of fermentation conditions for *Bacillus subtilis* producing neutral protease[J]. Genomics and Applied Biology, 2016, 35(1): 143-151 (in Chinese).
- [22] 田洪源, 李瑞芳. 响应面法在生物过程优化中的应用[J]. 食品工程, 2010(2): 8-11, 53.  
TIAN YY, LI RF. Application of response surface method on biological process optimization[J]. Food Engineering, 2010(2): 8-11, 53 (in Chinese).
- [23] BHANU PRAKASH GV, PADMAJA V, SIVA KIRAN RR. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(6): 1530-1537.
- [24] 杜广祖, 郑亚强, 陈斌, 和淑琪, 李正跃, 肖关丽, 袁丽美. 莱氏野村菌 Nr120815 菌株在不同稻谷基质上的产孢特性研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2016, 31(5): 791-798.  
DU GZ, ZHENG YQ, CHEN B, HE SQ, LI ZY, XIAO GL, YUAN LM. Study on the sporulation character of *Nomuraea rileyi* Nr120815 on different rice grainsmatrix[J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 2016, 31(5): 791-798 (in Chinese).
- [25] 薛锐, 刘思雨, 赵丽媛, 王小云, 葛文超, 陈斌. 黄绿绿僵菌 Ma130821 菌株的分子鉴定及产孢特性研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2018, 33(5): 842-849.  
XUE R, LIU SY, ZHAO LY, WANG XY, GE WC, CHEN B. Identification and conidial production characteristics of the *Metarhizium* sp. strain Ma130821[J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 2018, 33(5): 842-849 (in Chinese).
- [26] 唐维媛, 彭小东, 王欢, 周焕景, 张义明. 不同地域莱氏野村菌的培养性状及对斜纹夜蛾的毒力[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2013, 39(3): 279-281.  
TANG WY, PENG XD, WANG H, ZHOU HJ, ZHANG YM. Culturing characteristics of *Nomuraea rileyi* from different regions and their virulence to *Spodoptera litura*[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2013, 39(3): 279-281 (in Chinese).
- [27] 黄玉. 金龟子绿僵菌诱变选育及发酵条件优化研究[D]. 芜湖: 安徽工程大学硕士学位论文, 2020.  
HUANG Y. Study on mutagenesis of *Metarhizium anisopliae* and optimization of fermentation conditions[D]. Wuhu: Master's Thesis of Anhui Polytechnic University, 2020 (in Chinese).
- [28] KAVITHA R, DAMODHARAN N. Statistical optimization of prodigiosin production by plackett-burman design for bacteria isolated from Indian marine soil[J]. Journal of Pure and Applied Microbiology, 2021, 15(3): 1517-1526.
- [29] 张昊月, 郭正彦, 吕志堂, 陈义华. 应用响应面法优化发酵培养基提高托霉素产量[J]. 微生物学通报, 2021, 48(1): 113-122.  
ZHANG HY, GUO ZY, LV ZT, CHEN YH. Medium optimization with the response surface methodology to improve daptomycin production[J]. Microbiology China, 2021, 48(1): 113-122 (in Chinese).
- [30] GUNST RF, MYERS RH, MONTGOMERY DC. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments[J]. Technometrics, 1996, 38(3): 285.
- [31] MYERS RH. Response Surface Methodology[M]. New York: Wiley Ann Arbor Edwards Brothers, 1976.
- [32] 李鹏, 陈秀珍, 庄文颖. 高产纤维素酶的拟康宁木霉菌株 8985 固态发酵条件优化[J]. 菌物学报, 2021, 40(4): 743-758.  
LI P, CHEN XZ, ZHUANG WY. Optimization of solid state fermentation conditions for the high cellulase producing strain *Trichoderma koningiopsis* 8985[J]. Mycosystema, 2021, 40(4): 743-758 (in Chinese).
- [33] 刘阳. 固态发酵培养基物化特性及其固态发酵新工艺的研究[D]. 北京: 中国科学院大学(中国科学院过程工程研究所)博士学位论文, 2019.  
LIU Y. Physico-chemical properties of solid medium and novel solid-state fermentation process[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, 2019 (in Chinese).
- [34] 农向群, 张英财, 王以燕. 国内外杀虫绿僵菌制剂的登记现状与剂型技术进展[J]. 植物保护学报, 2015,

- 42(5): 702-714.  
NONG XQ, ZHANG YC, WANG YY. Advances in registration and formulation techniques of *Metarhizium* biological insecticides[J]. Journal of Plant Protection, 2015, 42(5): 702-714 (in Chinese).
- [35] 太一梅, 李志敏, 朱晓明, 刘萍, 李貌, 毕金华, 朱斌. 生物农药对草地贪夜蛾的田间防治效果[J]. 中国植保导刊, 2021, 41(3): 66-68, 77.  
TAI YM, LI ZM, ZHU XM, LIU P, LI M, BI JH, ZHU B. Effect of biological pesticides on control of fall army worm in corn fields[J]. China Plant Protection, 2021, 41(3): 66-68, 77 (in Chinese).
- [36] OHTANI T, YOSHINO T, USHIKI T, HAGIWARA S, MAEKAWA T. Structure of rice starch granules in nanometre scale as revealed by atomic force microscopy[J]. Journal of Electron Microscopy, 2000, 49(3): 487-489.
- [37] 王章存, 姚惠源. 大米蛋白质研究现状[A]//中国粮油学会第三届学术年会论文选集(下册)[C]. 烟台, 2004: 236-241.  
WANG ZC, YAO HY. Research status of rice protein[A]//Chinese Cereals and Oils Association[C]. Yantai, 2004: 236-241 (in Chinese).
- [38] 鲁战会. 生物发酵米粉的淀粉改性及凝胶机理研究[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2002.  
LU ZH. Raw starch modification in rice noodles and its gelatination mechanism induced by biological fermentation process[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2002 (in Chinese).
- [39] SILVA L, LOCH L. Sporulation of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson on polished rice grain media[J]. Anais Da Sociedade Entomologica Do Brasil: Brazil, 1987, 16(1): 213-222.
- [40] 周立峰. 莱氏野村菌的发酵工艺与田间应用潜力预测[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2011.  
ZHOU LF. Study on the fermentation technology of *Nomuraea rileyi* and the potential of field application[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2011 (in Chinese).
- [41] 彭小东, 唐维媛, 吕锡斌, 赵雪岩, 田辉, 张义明. 不同营养物质对莱氏野村菌 Nr16 生长的影响[J]. 贵州农业科学, 2013, 41(2): 115-119.  
PENG XD, TANG WY, LV XB, ZHAO XY, TIAN H, ZHANG YM. Effects of different nutrient substances on growth of *Nomuraea rileyi* Nr16[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2013, 41(2): 115-119 (in Chinese).
- [42] PATIL SD. Influence of different media on growth, biomass production, sporulation and concentrations of liquid form of *Nomuraea rileyi* inoculum's on its growth, development and bioefficacy against *Spodoptera litura*[J]. International Journal of Plant Protection, 2015, 8(2): 288-294.
- [43] 宋漳. 白僵菌分生孢子深层培养及其对马尾松毛虫的毒力[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(1): 93-97.  
SONG Z. Submerged culture of *Beauveria bassiana* and its virulence test on *dendrolimus punctatus*[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2005, 11(1): 93-97 (in Chinese).
- [44] TINLINE RD, NOVIELLO C. Heterokaryosis in the entomogenous fungus, *Metarrhizium anisopliae*[J]. Mycologia, 1971, 63(4): 701-712.
- [45] YURCHENKO L, ZAKHAROV LA, LEVTTIN MM. Genetique selection du champignon entomopathogene *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill Etude de l'heterocaryose[J]. Genetika, 1974, 10: 95-101.
- [46] 雷妍圆, 吕利华, 何余容, 陈冬虹. 球孢白僵菌生物学特性与其对小菜蛾致病力相关性分析[J]. 中国生物防治, 2010, 26(2): 143-148.  
LEI YY, LV LH, HE YR, CHEN DH. Correlation between biological characteristics of *Beauveria bassiana* and its virulence to *Plutella xylostella*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2010, 26(2): 143-148 (in Chinese).
- [47] CHARNLEY A. Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi: a speculative review[C]. London: Academic Press Symposium Series-British Mycological Society, 1984.
- [48] 林海萍, 魏锦瑜, 毛胜凤, 陈喜, 张立钦, 马良进. 球孢白僵菌蛋白酶、几丁质酶、脂肪酶活性与其毒力相关性[J]. 中国生物防治, 2008, 24(3): 290-292.  
LIN HP, WEI JY, MAO SF, CHEN X, ZHANG LQ, MA LJ. Correlation between protease, chitinase and lipase activities and virulence of *Beauveria bassiana* against *Monochamus alternatus*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2008, 24(3): 290-292 (in Chinese).