

蜡蚧轮枝菌昆明菌株 (KM9803) 的生物学特性研究 (二) *

——培养基种类、储藏条件对菌落生长、 产孢量和孢子萌发率的影响

徐力文, 周天雄 **, 杨美林
(云南农业大学植物保护学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 用7种培养基培养的结果,在麦芽汁培养基(MEA)上(23℃)得到最大产孢量(4.7×10^9 分生孢子/皿);用6种谷物的固体培养基试验中,大米粒培养基最适宜产孢,发酵培养10d得到最大产孢量 1.5×10^9 分生孢子/g,孢子萌发率95.14%。3种储藏条件试验的结果,以4℃冰箱中黑暗下6个月的孢子萌发率最高(91.47%)。

关键词: 培养基; 储藏条件; 菌落; 分生孢子; 产孢量; 萌发率

中图分类号: Q 935 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X(2006)02-0175-03

A Study of Biological Character of *Verticillium lecanii* KM9803 Strain Isolated from Kunming (II)

——The Effects of Media Kinds and Preserved Condition on Colonial Growth, Conidiospore Yield and Conidia Germination Rata

XU Li-wen, ZHOU Tian-xiong, YANG Mei-lin

(College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: The maximum sporulation yield (4.7×10^9 conidia/dish) was obtained on MEA media at 23℃. Experiments of culturing the fungus on six solids grain media showed the rice grain was the most suitable for sporulation yield, as 1.5×10^9 conidia/g fermented for 10 days. The result of experiments on three kinds preserved condition showed the germination rate of conidiospore was 91.4% in 4℃ refrigerator after 6 months.

Key words: media; preserved condition; colonial growth; conidiospore yield; conidia germination

1 材料与方法

1.1 供试菌种

经扩大培养的 KM9803 菌株。

1.2 营养条件对菌落生长和产孢量的影响

取直径 10 mm 菌块分别置于查彼克 (CzA), 马

铃薯葡萄糖 (PDA), 马铃薯蛋白胨葡萄糖 (PPDA), 沙氏葡萄糖 + 酵母膏 (SDAY), 沙氏麦芽糖 + 酵母膏 (SMAY), 燕麦培养基 (OA), 麦芽汁培养基 (MEA) 等 7 种固体培养基上, 每种培养基设 5 次重复, 置 $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$, 16L:8D 的光照培养箱中, 每天测量并记录 1 次菌落直径, 连续 15 d, 最后用血球计数器测定

收稿日期: 2005-08-30

* 基金项目: 教育部重点项目 (02143)

** 通讯作者

作者简介: 徐力文 (1975-), 男, 湖北武汉人, 硕士研究生, 主要从事微生物农药研究。

每皿产孢量,并对结果进行统计分析。

1.3 固体培养基大量产孢试验

选择大麦、小麦、大米、麦麸和碎玉米作为固体培养基材料,将谷物用开水浸泡 48 h 后在室内晾干,分装玻璃罐头瓶中。碎玉米每瓶装 15 g,麦麸每瓶 10 g(加有少量米糠),其余各装 20 g。每瓶加自来水适量,用双层牛皮纸蒙口,126 °C 灭菌 30 min 后充分摇松冷却,每瓶加 1.0×10^8 孢子/mL 芽生孢子液 10 mL 充分拌匀,每种培养基 3 次重复,置于 25 °C 温箱中黑暗培养 10 d 后,称取一定量的已长孢子的固体培养基,将孢子洗脱并适当稀释后,记数孢子量,并进行孢子萌发试验。

1.4 储藏条件对孢子萌发率的影响

用 10 mm 打孔器取培养 10 d 的沙氏(SDAY)培养基上的蜡蚧轮枝菌 KM9803 菌株的菌块,接种于 250 mL 三角瓶中经灭菌的 100 mL 沙氏(SDAY)培养液中,室温下 120r/min 摇床培养 5~7 d 至菌液浓稠时(镜检芽生孢子浓度达到 1.0×10^8 孢子/mL 以上),过滤离心,稀释为 1.0×10^8 孢子/mL 浓度。将灭菌后的 PDA 培养基取 30 mL,倒入经灭菌的 9 cm 培养皿中,制作成 PDA 平板,共制作 15 皿。每皿接入上述 1.0×10^8 /mL 芽生孢子液 5 mL,涂布均匀,置 23 °C 16L:8D 光照培养箱中,培养 15 d 后,用保鲜膜包扎好,倒置于 4 °C 冰箱中(黑暗下)、25 °C 温箱中(黑暗下)和实验室内(室温下)等 3 种储藏条件下,每条件下 5 皿。每隔 2 个月用 1% 葡萄糖无菌水测定 1 次孢子萌发率。

2 结果

2.1 营养条件对菌落生长和产孢量的影响(见表 1)

2.2 固体培养基大量产孢试验结果(见表 2)

2.3 储存条件对分生孢子萌发率的影响

在 6 个月内,每隔两个月用 1% 葡萄糖无菌水配制孢子悬浮液,在沙氏(SDAY)培养基上, (23 ± 1) °C 进行孢子萌发试验,观察 24 h 分生孢子萌发率,得以下结果(见表 3)。

3 讨论

KM9803 菌株在 7 种培养基上都生长迅速,15 d 后菌落直径以燕麦片培养基(OA)上最大(菌落薄而疏松),但与马铃薯蛋白胨(PPDA)和马铃薯葡萄糖培养基(PDA)差异不大;菌落厚度和菌丝致密度则以麦芽汁培养基(MEA)和查彼得培养基(CzA)最好,菌落圆形洁白,致密绒毛状。产孢量以 MEA 较高,为 4.70×10^9 分生孢子/皿,但菌落直径相对较小。CzA 的产孢量为 3.46×10^9 分生孢子/皿,表明这两种培养基有利于菌株产孢。

6 种谷物的固体培养基培养试验结果显示,除麦麸以外,其它固体培养基材料的产孢量都较高。其中,以大米培养基的产孢量最高,达到 1.50×10^9 分生孢子/g;孢子萌发率也最高,达到 95.14%。本试验仅是一个初步的筛选结果;因为,几种产孢量较高的固体培养基的成本还较高。以后还需研究和筛选产孢量高、成本低的固体培养基配方。

表 1 7 种培养基上 KM9803 菌株 15 d 菌落生长情况和产孢量

Tab. 1 The growth condition and conidiospore yield of KM9803 isolate on 7 kinds of media after 15 d

培养基 media	菌落生长情况 growth condition of colony		菌落直径 diameter of colony (mm ± SE)	平均产孢量 conidiospore yield /(分生孢子 · 皿 ⁻¹)
	厚度 thickness	致密度 density		
MEA	+++	+++	47.20 ± 0.64 aA	4.70×10^9 aA
CzA	+++	+++	50.67 ± 0.72 bB	3.46×10^9 bB
OA	—	—	58.75 ± 0.53 cC	2.35×10^9 cC
SEAY	++	+++	48.93 ± 0.68 aA	2.21×10^9 cC
SAY	++	+++	49.33 ± 0.87 aA	1.97×10^9 dD
PPDA	++	++	55.57 ± 0.55 cC	1.83×10^9 dD
PDA	+	+	56.07 ± 0.69 cC	9.67×10^8 eE

注:(1)菌落生长情况:“—”薄而疏松;“+”较薄,较疏松;“++”厚而致密;“+++”最厚,最致密。

(2)SE:标准误。

(3)各培养基菌落背面均呈奶油色,有明显的放射状皱折;PDA 上还有环状纹。

(4)菌落直径和产孢量数据后的英文字母相同表示差异不显著。小写字母表示 5% 水平的差异显著性;大写字母表示 1% 水平的差异显著性。

表2 KM9803菌株在6种固体培养基上的产孢量

Tab.2 The conidiospore yield of KM9803 isolate produced on 6 kinds of solid media

培养基 media	发酵天数/d cultural time	分生孢子产量($\times 10^9$ 孢子 $\cdot g^{-1}$) conidiospore yield	萌发率/% conidiospore germination rate
		3次重复平均值 \pm SE	
大米	10	1.50 \pm 0.52 aA	95.14
小米	10	1.12 \pm 0.46 bcBC	94.32
麦麸	10	1.29 \pm 0.27 bB	80.16
大麦	10	0.98 \pm 0.74 cdCD	94.24
小麦	10	0.87 \pm 0.57 dD	92.64
碎玉米	10	0.63 \pm 0.22 eE	94.28

注:分生孢子产量数字后的英文字母相同表示差异不显著。小写字母表示5%水平的差异显著性;大写字母表示1%水平的差异显著性。

表3 不同储存条件下分生孢子的萌发率

Tab.3 The conidiospore germination rate in different preserved condition

储存条件 storage condition	分生孢子萌发率/% conidiospore germination rate		
	2个月	4个月	6个月
4℃冰箱中(黑暗)	98.87	96.32	91.47
室内阴凉处	91.64	78.59	65.93
25℃恒温箱中(黑暗)	88.04	63.29	54.72

注:未经储存的分生孢子24h萌发率100%。

3种储藏条件的试验结果显示,低温条件下保存,分生孢子萌发能力保持的时间相对较长,萌发率较高。依照 COUCH 等(1980)的标准,活体微生物制剂中活性部分的储藏期必须在18个月以上;如果应急使用,3~6个月的稳定性是可以接受的。为了实用起见,制剂中的孢子在储藏1年后,必须保持70%以上的活孢率。分生孢子在培养基上和制剂中的微环境是不一样的。制剂中添加有大量的辅助成分;应用中也不可能长期在低温下保存。因此,能长期保持制剂中分生孢子萌发能力的制剂配方和制剂方法的研究十分重要。蜡蚧轮枝菌商品化开发应用的另一个障碍性问题是制剂中孢子活力的保持时间——制剂的有效保存期。根据上述研究结果,培养皿中PDA平板菌落上分生孢子6个月内不同保存条件下的萌发率,以4℃冰箱中保存的最高,其次是室内阴凉处;而25℃温箱中(黑暗下)最低。况且,6个月的有效期还不够长。因此,研究筛选能在较长时间内保持孢子活力的制剂配方和技术,是该菌制剂商品化的一个关键

性问题。

[参考文献]

- [1] 李国霞,严毓骅,王丽英. 温度和营养对北京地区蜡蚧轮枝菌生长发育的影响[J]. 生物防治通报,1991,7(3):115-119.
- [2] 李国霞,高希武,刘青春,等. 蜡蚧轮枝菌的发酵培养及其代谢产物对害虫毒杀作用的初步研究[J]. 北京农业大学学报,1995,21(4):409-415.
- [3] 张仙红,贺运春,于桂风,等. 昆虫病原真菌蜡蚧轮枝菌生物学特性初步研究[J]. 山西农业大学学报,2000,20(3):221-224.
- [4] EASWARAMOORTHY S, JAYARAJ S. The effect of temperature, pH, and media on the growth of the fungus *Cephalosporium lecanii* [J]. J. Invert. Pathol, 1977, 29:399-400.
- [5] FENG K C, LIU B L, TZENG Y W. *Verticillium lecanii* spore production in solid-state and liquid-state fermentations [J]. Bioprocess Engineering, 2000, 23(1): 25-29.
- [6] HALL R A. Effect of repeated subculturing on agar and passaging through an insect host on pathogenicity, morphology, and growth rate of *Verticillium lecanii* [J]. Invert. Pathol, 1980, 36:216-222.
- [7] KHALIL S K, BARTOS J, TABORSKY V. Effect of temperature, pH of the medium and sugar in the germination of spores, development of mycelium and sporulation of the entomopathogenic fungus, *Verticillium lecanii* [J]. Agric. Trop. et Subtr., Univertitas Agriculture Praga, 1983, 16:255-274.