

微量元素及维生素对蜡蚧轮枝菌分生孢子的影响

刘春来, 李新民, 王克勤, 刘兴龙, 王 爽
(黑龙江省农业科学院植物保护研究所, 哈尔滨 150086)

摘要:通过定量地向平皿 PDA 培养基中添加 6 种微量元素和 7 种维生素, 并接种蜡蚧轮枝菌菌株 Tri-BA81 进行培养研究, 初筛出微量元素 Mn 和 Ni、维生素叶酸(VM)和烟酸(VB₃)对分生孢子的产生具有促进作用。对初筛出的微量元素和维生素设置不同的浓度梯度添加到单一固体基质谷子中, 进行发酵筛选, 结果表明, 微量元素 Mn 和 Ni 的最适使用浓度均为 25 μg·mL⁻¹; 维生素叶酸(VM)、烟酸(VB₃)的最适使用浓度分别为 10、1 μg·mL⁻¹。
关键词:蜡蚧轮枝菌; 微量元素和维生素; 固体发酵; 分生孢子
中图分类号:S476⁺.12 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2008)04-0009-03

Effects of Micro Elements and Vitamins on Sporulation of *Verticillium lecanii*

LIU Chun-lai, LI Xin-min, WANG Ke-qin, LIU Xing-long, WANG Shuang
(Plant Protection Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086)

Abstract: Six micro elements and seven vitamins were added quantitatively into PDA culture medium in petri dish, then *Verticillium lecanii* isolate Tri-BA81 was inoculated at culture medium, it showed micro element Mn, Ni, and vitamin acidum folicum (VM) and nicotinic acid (VB₃) could promoted sporulation. The objective micro elements and vitamins with different concentration gradients added in single solid substrate millet grain were selected for the solid fermentation. The results showed the suitable micro element Mn and Ni concentration was equal 25 μg·mL⁻¹, vitamin acidum folicum (VM) and nicotinic acid (VB₃) concentration were 10 and 1 μg·mL⁻¹, respectively.
Key words: *Verticillium lecanii*; micro elements and vitamins; solid-state fermentation; sporulation

蜡蚧轮枝菌(*Verticillium lecanii*)属半知菌类丛梗孢目丛梗孢科, 轮枝菌属真菌^[1]。是一种分布广泛, 可寄生同翅目、鳞翅目和缨翅目等多种害虫的昆虫病原真菌^[2], 有的菌株还能寄生植物病原线虫和锈菌、白粉菌等植物病原真菌。20 世纪 80 年代国外就将该菌注册登记, 并有多个产品用于温室等场所蚜虫、粉虱和蓟马等害虫的防治^[3-4]。我国 90 年代后在大力发展设施农业的形势下, 蜡蚧轮枝菌的研究才得到极大的重视。目前蜡蚧轮枝菌大量生产工艺大多采用固体发酵或液-固双相法, 李国霞^[5]、李锋^[6]等对发酵生产中影响分生孢子产量的

因素进行了研究, 但关于微量元素及维生素对分生孢子产生的影响报道较少, 本文就这一因素的影响进行了初步研究, 为蜡蚧轮枝菌生物农药的规模化生产及菌剂研制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

蜡蚧轮枝菌 Tri-BA81 由俄罗斯全俄植保所提供。已有的研究表明该菌株的分生孢子的萌发率和对害虫的致病性都较强。

1.2 试验所用的微量元素和维生素种类

微量元素:硫酸锌(ZnSO₄·7H₂O)、硫酸铜(CuSO₄·5H₂O)、硫酸铝(Al₂(SO₄)₃·18H₂O)、硫酸锰(MnSO₄·H₂O)、硫酸银(Ag₂SO₄)、硫酸镍(NiSO₄·6H₂O)。

维生素:盐酸噻胺(VB₁、C₁₂H₁₇ClN₄OS·HCl)、核黄素(VB₂、C₁₇H₂ON₄O₆)、D-泛酸钙(VB₅、C₉

收稿日期: 2008-02-15
基金项目: 农业部农业科技成果转化项目(农计函(2003)165号); 黑龙江省农业科学院青年基金项目(2005)
第一作者简介: 刘春来(1975-), 男, 山东省平度市人, 硕士, 助理研究员, 从事微生物生物防治研究。E-mail: liuchunlai@163.com。
通讯作者: 李新民(1964-), 男, 甘肃省成县人, 硕士, 研究员, 从事微生物生物防治研究。

H₁₆NO₅⁺ 1/2Ca)、盐酸吡哆醇(VB₆、C₈H₁₁NO₃⁺ HCl)、叶酸(VM、C₁₉H₁₉N₇O₆)、抗坏血酸(VC、C₆H₈O₆)、烟酸(VB₃、C₆H₅NO₂)。

1.3 培养基

1.3.1 基础斜面培养基 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基。

1.3.2 液体培养基 以不加琼脂的马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基作为接种固体发酵基质的二级菌种培养基。

1.3.3 固体基质培养基 选用单一基质谷子为固体原料。

1.4 微量元素及维生素对蜡蚧轮枝菌分生孢子产生的影响初筛试验

PDA 培养基中加入预先配制的微量元素或维生素液,分别制成含 50 μg·mL⁻¹微量元素的 PDA 培养基或含 10 μg·mL⁻¹维生素的 PDA 培养基,以不加微量元素或维生素为对照。在斜面 PDA 培养基上培养 7 d 后的蜡蚧轮枝菌株(一级菌种)加入 0.05% Tween-80 无菌水,充分振荡,获得孢子悬浮液(浓度为 1.21×10¹⁰个·mL⁻¹)。用微量移液器吸取 0.5 mL 接种于固体 PDA 平板上,用刮铲将孢悬液涂布均匀,每个处理 3 次重复。将接种的平皿放于 25℃的温箱内,培养 7 d 左右后,每平皿中加入 30 mL 0.05%的 Tween-80 无菌水收集分生孢子,用血球计数板计数分生孢子的产量。

1.5 不同浓度的目标微量元素及维生素对产孢量的影响研究

目标微量元素浓度设置: 浓度梯度依次为 0、1、10、25、50、75、100、和 150 μg·mL⁻¹共 8 个处理,每处理 3 次重复。

目标维生素浓度设置: 浓度梯度依次为 0、1、10、25、50、75 和 100 μg·mL⁻¹共 7 个处理,每处理 3 次重复。

液体发酵: 活化后的一级斜面菌种中加入 0.05% Tween-80 无菌水,充分振荡,获得孢子悬浮液。取 0.5 mL 孢子悬浮液接种于 PDA 平板上,涂布均匀后,置 25℃培养箱培养。待菌丝长满培养皿后,用打孔器打成菌碟(直径 0.8 cm),将菌碟 5~10 个接种到装液量为 200 mL 的三角瓶中,置 25℃、160 r·min⁻¹摇床上振荡培养 3 d。用血球计数板计数芽生孢子量,作为接种固体发酵基质的二级种子液。

固体发酵: 将固体基质原料谷子与稻壳按 7:3 的比例(重量比)混匀后装入玻璃罐头瓶中。每瓶装固体基料 50 g,同时,加入蒸馏水 50 mL(基质:水=1:1 的比例),浸泡 24 h 后灭菌;自然冷却后接入二级种子液 5 mL(2.56×10⁹个·mL⁻¹),用无菌

的玻璃棒充分搅匀,牛皮纸封口,3~4 个重复,置于相对湿度 85%~95%、25℃培养箱内培养 7 d。

1.6 分生孢子产量测定

称取固体发酵物 20 g 装入内有若干个玻璃珠的三角瓶中,加入 180 mL 0.05% Tween-80 无菌水,放到摇床上充分振荡 30 min(170 r·min⁻¹),获得孢子悬浮液,用血球计数板计数分生孢子量,3~4 个重复。

1.7 结果统计

试验数据用 SPSS 统计软件进行 Duncan's 新复极差分析。

2 结果与分析

2.1 微量元素及维生素对蜡蚧轮枝菌分生孢子产生的影响

通过向 PDA 培养基定量添加微量元素和维生素,对蜡蚧轮枝菌分生孢子的产量影响进行初筛研究。结果表明,添加硫酸锰和硫酸镍处理分生孢子的产量均高于对照,而其它的微量元素处理分生孢子的产量均低于对照(见图 1)。添加叶酸和抗坏血酸处理产孢量均达到了 6.00×10¹⁰个·皿⁻¹,比对照高 1.64 倍(见图 2)。研究也表明部分微量元素(Ag、Al)和维生素(VB₁、VB₆)对分生孢子的产生有抑制作用。因此,选择对分生孢子的产生有促进作用的硫酸锰、硫酸镍、叶酸和抗坏血酸作为下一步筛选的目标微量元素和微生素。

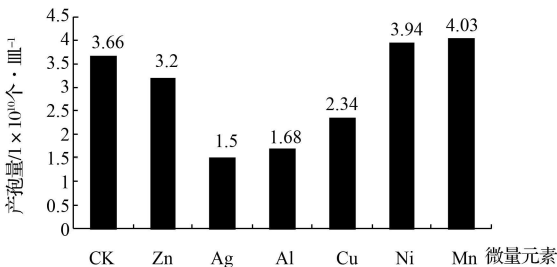


图 1 微量元素对分生孢子产生的影响

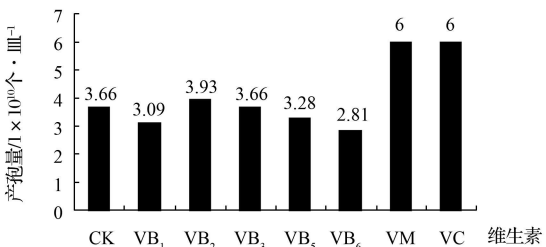


图 2 维生素对分生孢子产生的影响

2.2 不同浓度的目标微量元素对产孢量的影响

通过向固体基质中添加不同浓度水平的硫酸锰进行发酵,浓度水平在 25~150 μg·mL⁻¹处理蜡蚧轮枝菌分生孢子产量均高于对照,且促进作用随浓度的增高而降低(见图 3)。25 μg·mL⁻¹处理分生孢子产量最高,达到了 1.08×10¹⁰个·g⁻¹,是对照的

1.96 倍,且与对照比达到了显著性水平。

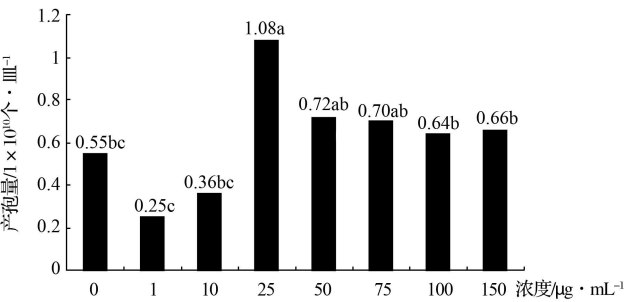


图 3 硫酸锰对分生孢子产生的影响

硫酸镍各浓度处理对分生孢子的产生均有促进作用。但 25 μg · mL⁻¹ 和 50 μg · mL⁻¹ 处理促进作用最强,分生孢子产量分别是对照的 2.71 倍和 2.43 倍,且都与对照相比达到了显著性水平。浓度在 1~25 μg · mL⁻¹ 促进作用随浓度的增加而增强;50~150 μg · mL⁻¹ 促进作用随浓度的增加而减弱(见图 4)。

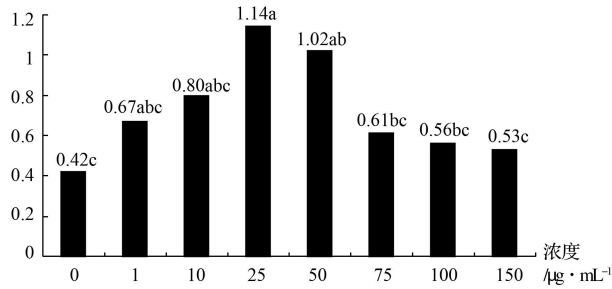


图 4 硫酸镍对分生孢子产生的影响

2.3 不同浓度的目标维生素对产孢量的影响研究

不同浓度水平的叶酸对蜡蚧轮枝菌分生孢子产生的影响研究表明,1 μg · mL⁻¹ 和 10 μg · mL⁻¹ 浓度处理对分生孢子产生具有促进作用(见表 3)。10 μg · mL⁻¹ 浓度处理分生孢子产量是对照的 1.65 倍,达到了显著差异水平。其它浓度处理均产生了抑制作用。

表 3 叶酸对分生孢子产生的影响

浓度 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	产孢量 1×10^{10} 个 $\cdot \text{g}^{-1}$		
	最高	最低	平均
0	0.563	0.219	0.426b
1	0.547	0.375	0.488ab
10	1.125	0.344	0.703a
25	0.484	0.281	0.359b
50	0.641	0.234	0.408b
75	0.469	0.234	0.332b
100	0.359	0.172	0.250b

注:平均值后标的字母相同,表示 Duncan 氏测验 $p=0.05$ 差异不显著,下同。

抗坏血酸各浓度处理分生孢子产量除 50 μg · mL⁻¹ 处理较对照低外,其它各浓度处理分生孢子产量均高于对照,但增产作用都不明显,且各浓度的处理的产

孢量均与对照比都未达到显著性水平(见表 4)。

表 4 抗坏血酸对分生孢子产生的影响

浓度 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	产孢量 1×10^{10} 个 $\cdot \text{g}^{-1}$		
	最高	最低	平均
0	0.594	0.203	0.316ab
1	0.813	0.250	0.453a
10	0.469	0.313	0.379ab
25	0.469	0.250	0.332ab
50	0.219	0.189	0.234b
75	0.332	0.203	0.332ab
100	0.39	0.250	0.320ab

3 结论与讨论

在微量元素对产孢的影响中,已有人研究证实了 Zn 对产孢及生长具有最显著的作用。范晓莉^[7]、罗小刚^[8] 研究了在液体培养条件下添加 Zn 元素对菌丝生长与产孢具有重要的影响,并明确了 Zn 元素使用的不同的最适浓度范围。本文研究了固体培养条件下微量元素对蜡蚧轮枝菌分生孢子产生的影响,结果表明, Mn 和 Ni 两种元素的影响最大, Zn 元素次之。这一结果的产生是否与液体培养条件下芽生孢子的形成机制与固体培养条件下分生孢子的产生机制不同造成的,需做进一步研究。

真菌的生长需要一些少量的有机物质,如维生素等。其作用一般都是辅酶的成分或充当辅酶的功能。本文也研究维生素对蜡蚧轮枝菌分生孢子产生的影响,筛选出叶酸和抗坏血酸两种维生素,在对其做发酵筛选试验时,结果产生的效果并不是很明显。这可能是由于真菌在发酵过程中都能够自己合成所需的维生素,对蜡蚧轮枝菌产孢并没有产生很大的影响,因此,在大量生产中建议无需补充维生素。

参考文献:

[1] 刘春来,王克勤,李新民等.蜡蚧轮枝菌素对 5 种蚜虫毒杀作用的初步研究[J].中国农学通报,2003,4(2):77-79.

[2] 李新民,王克勤,刘春来等.保护地常用农药对蜡蚧轮枝菌菌丝生长影响研究[J].植物保护,2003,29(5):19-21.

[3] ROMBACH N C, Gillespie A T. Enomogenous hyphomycetes for insect and mite cotrol on greenhouse crops[J]. Biocontrol News and Information, 1988, 9(1): 7-18.

[4] HALL R A. Epizootic potential for aphids of different isolates of the fungus, Verticillium lecanii for use in glasshouses[J]. Entomophaga, 1994, 29: 311-321.

[5] 李国霞,周夏娣.影响蜡蚧轮枝菌发酵产孢量和孢子活力的基本因素分析[J].昆虫天敌,2001,23(2):49-54.

[6] 李锋,殷华,蒋继宏等.蜡蚧轮枝菌固体培养条件研究[J].江苏农业科学,2004(4):57-58,109.

[7] 范晓莉.蜡蚧轮枝菌 CA-192 生物学特性的研究[D].长春:中国人民解放军军需大学硕士论文,2003.

[8] 罗小刚.昆虫病原真菌蜡蚧轮枝菌的研究[J].贵州农学院丛刊,1990(1):52-68.