

粉质拟青霉的初步研究

陈祝安 黄基荣 许益伟 葛岚屏

(浙江省科学院亚热带作物研究所)

摘要 本文观察了粉质拟青霉产孢量高峰在 20 天左右。培养时间延长,产孢量有下降的趋势。在适温和相对湿度饱和状态下,分生孢子经 2 小时萌发,48 小时见次代分生孢子链产生。此菌对碳源中的蔗糖, D-甘露糖, D-半乳糖,乳糖,甘油,赤藓糖,可溶性淀粉;氮源中的谷氨酸,谷氨酰胺,丙氨酸利用好。田间小面积使用 1.2×10^7 孢子/ml 悬浮液喷雾,对菜螟幼虫感病死亡率达 90%。

关键词 粉质拟青霉;毒力试验;菜螟

粉质拟青霉(*Paecilomyces farinosus* Brown et Smith) 是重要的昆虫病原真菌^[1,3],寄生在多种害虫上。1983 年从黑刺粉虱 (*Aleurocan-*

thus spiniferus) 上分离纯化得到。现将培养条件,碳氮源利用以及毒力试验等初步结果报道如下。

材 料 和 方 法

(一) 菌株来源

从纯净虫尸上按常规法分离纯化保种。

(二) 孢子产量

以大米饭为培养基,装在试管内,每管20g,灭菌后接入0.5 ml 孢子悬浮液,置 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 培养,定期检测孢子产量。测定方法是取一定样品,用适量倍数水稀释以血球计数器测定悬浮液的含孢量,再换算成每克鲜菌剂的孢子产量。

(三) 培养条件

1. 温度: 用0.5%葡萄糖液为载体的孢子悬浮液,点殖在灭过菌的载片上,置于培养皿中保湿(底铺湿纱布),分别置不同温度下温育,定时记录孢子萌发率、芽管长度、产孢结构形成和分生孢子链产生。温度对菌丝生长量影响,采用马铃薯-蔗糖培养液15 ml,加入试管中,灭菌后接入0.5 ml 孢子悬浮液,置各组温度下静培养10天,重复2次,然后取出菌丝体烘至恒重称量。

2. 湿度: 以不同的饱和盐溶液在密闭容器里控制湿度。饱和盐溶液包括 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (RH 90%); KCl (RH 87%); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (RH 81%); NaCl (RH 76%); NaNO_3 (RH 66%); NaBr (RH 56%); H_2O (RH 100%)。用0.5%葡萄糖液为载体,点殖孢子后快速风干,置各种湿度下培养(20°C),重复4次。

3. pH: 将马铃薯-蔗糖液分别装于试管内,每管10 ml,重复2次,用3 N NaOH 和0.5% HCl 调正酸碱度,以精密pH值试纸测定,接入等量孢子悬浮液于 24°C 作液体静培养10天,过滤菌丝体,烘至恒重称量。

(四) 碳氮源利用

1. 碳源: 用灭菌水配制含0.5%的各种糖溶液,分别点滴于载片上,殖入经水洗孢子*,于 24°C ,培养皿内保湿培养,并比较24小时孢子萌发,48小时芽管长度及孢子链多寡和长度。

2. 氮源: 试验方法同碳源,但氮源浓度采用0.2%。

(五) 毒力测定

试验用菌剂是将斜面种逐级扩大到煮熟麦粒上,发酵20天。使用时将鲜菌剂加适量灭菌水浸提,其滤液用血球计数器标定孢子含量,再按所需浓度稀释。

测定时共分 2.3×10^7 ; 7.6×10^6 ; 2.5×10^6 ; 8.0×10^5 ; 3.0×10^5 孢子/ml 等5种浓度,每种浓度处理30头幼虫,重复2次,对照喷清水。处理后幼虫置玻璃缸内饲养,每天饲新鲜甘兰菜叶,并统计感病死亡虫数。数据处理按机值分析法。

结 果 和 讨 论

(一) 产孢量试验

该菌在大米饭培养基上生长良好,并形成分生孢子。经测定产孢量高峰在20天左右,每克鲜菌剂含 1.8×10^8 孢子,延长培养期,孢子量有下降的趋势。例如培养35天孢子产量下降到每克 1.03×10^8 (图1)。

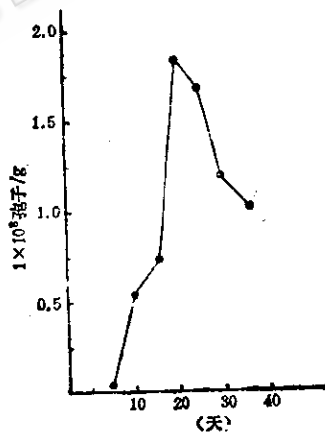


图1 培养时间和产孢量

(二) 温、湿度和 pH 值

1. 温度对芽管生长的影响: 分生孢子置 24°C 经24小时培养,平均芽管长度为 $87.9 \mu\text{m}$,比其他温度组生长略快(表1)。

2. 温度对产孢结构形成的影响: 在保湿条件下,经2小时,孢子开始萌发,24小时各温度

* 在无菌条件下,加适量灭菌水于斜面种管,洗下孢子,置1000 r/min 离心5分钟,涂去上层澄清液,再水洗离心,连续3次。

表1 温度对芽管生长的影响

温度(°C)	考察孢子数	芽管平均长度(μm)
24	30	87.9
26	30	65.5
28	30	59.8
30	30	38.1

组的孢子普遍萌发,48小时26℃组见孢子链产生,72小时各组均见不同数量孢子链,尤以26℃组为多(表2)。

表2 温度对产孢结构的影响

温度(°C)	考察孢子数(个)	萌发率(%)	孢子链		
			24小时	48	72
24	1200	93.5	—	—	+
26	1200	97.3	—	++	+++
28	1200	96.5	—	—	+
30	1200	89.3	—	+	+

产生孢子链数量:“—”无,“+”少量,“++”中等,“+++”很多

3. 温度对菌丝生长量的影响(表3):从表3看出,菌丝产量以22—28℃为好,但培养温度高比温度低的菌落容易老化,一般以24℃为佳。

表3 温度和菌丝体产量的关系

试验温度(°C)	菌丝体干重(mg)
18	24.6
20	315.0
22	344.4
24	355.9
26	396.2
28	406.9
30	189.8

4. 相对湿度对孢子萌发的影响 人工控制湿度, RH > 90% 以上者,经48小时培养萌发率在70—98%。但在RH 58%的低湿条件下,亦见少量孢子萌发,说明该菌对湿度要求较宽(表4)。

5. pH 值:从菌丝体生长量来看,氢离子浓度对该菌生长影响不大(极端除外)。至于pH对产孢量、孢子活性及代谢产物是否有影响,需作进一步观察和验证(表5)。

表4 相对湿度对孢子萌发的影响

相对湿度(%)	观察孢子数	平均萌发率(%)			
		24小时	48小时	72小时	96小时
100	1200	63.5	97.8	—	—
90	1200	24.7	69.8	75.2	84.9
87	1200	0.7	2.2	3.2	3.2
81	1200	0.2	0.8	1.0	2.2
76	1200	0.0	2.2	2.2	2.2
66	1200	0.0	0.2	0.2	0.3
58	1200	0.0	0.2	0.2	0.3

表5 pH 对菌丝生长影响

pH 值(消毒后)	菌丝干重(mg)
2.0	49.5
4.0	65.1
4.5	68.7
5.0	70.8
6.0	68.4
7.0	—
7.5	66.2
8.0	59.1
9.0	50.1

表6 病原对碳源的利用

C 源	含C原子	萌发率(%)	24小时平均芽管长(μm)	48小时孢子链长(μm)	生育情况	孢子链多寡
蔗糖	C ₁₂	97.5	132.2	2.8—19.6	气生菌丝旺,孢梗长,单生	+
葡萄糖	C ₆	97.7	58.7	2.8—8.4	孢梗单生,密集,链较短	++
D-甘露糖	C ₆	99.1	115.4	5.6—14.0	孢梗单生,密集,链较长	+++
L-山梨糖	C ₆	96.6	30.8	2.8—8.4	孢梗多见,单生,链短	+++
乳糖	C ₁₂	—	—	2.8—14.0	孢梗密集,单生居多,亦见轮生,链较长	+++
D-半乳糖	C ₆	96.7	31.1	2.8—25.9	孢梗多,单、互、轮生,链长	+++
丙三醇	C ₃	99.7	117.2	8.4—19.6	孢梗单生,互生、轮生,链长	+++
赤藓糖	—	79.5	52.5	5.6—14.0	气生菌丝稀疏,链较长	+++
鼠李糖	—	42.8	12.3	13.0—28.0	气生菌丝较茂密,链长	++
马铃薯淀粉	C _n	—	—	13.0—22.4	—	+++
树脂糖	—	96.1	30.2	2.8	—	+++
柠檬酸	—	—	—	—	—	—

注:不长“—”;少量“+”;一般可见“++”;多“+++”;很多“++++”

(三) 不同碳氮源试验

1. 碳源 对 12 种碳源的试验结果,除柠檬酸不长外,皆能生长,并产生孢子链。其中, D-甘露糖,甘油、乳糖, D-半乳糖,赤藓糖,可溶性淀粉等产生孢子链多(表 6)。

2. 氮源 对 10 种氮源观察结果,谷氨酸,谷氨酰胺,丙氨酸生长好,产孢量亦多。尿素中不萌发, KNO_3 、 $(NH_4)_2SO_4$ 生育差(表 7)。

表 7 病原对氮源的利用

N 源	24 小时萌发率 (%)	48 小时芽管长 (μm)	96 小时生育状况
丙氨酸	91.9	37.6	气生菌丝茂密,孢子链较多
天冬酰胺	83.9	42.5	菌丝稀,孢子链少
谷氨酰胺	94.2	30.2	菌丝茂密,孢子链多
组氨酸	95.1	47.1	菌丝短而稀,孢子链少
谷氨酸	83.6	65.4	菌丝茂密,孢子链一般
半胱氨酸	92.8	29.2	菌丝短而稀,孢子量甚少
DNA	73.8	10.2	菌丝稀疏,孢子链一般
尿素	0.0	0.0	不长
硝酸钾	67.3	17.7	菌丝稀疏,孢子少
硫酸铵	47.6	20.6	菌丝稀短,孢子链可见

(四) 毒力试验

以菜蛾 (*Oecobia undalis* Fabricius) 幼虫为测定对象,室内毒力试验结果是:处理个体 24 小时开始发病,7 天后不发病的相继进入蛹期。菌剂浓度和寄主死亡率间关系按机值分析法计算得毒力回归式 $Y = 3.86 + 0.8X$; X^2 值 2.56。由此式计算 LC_{50} 为 2.12×10^6 孢子 ml^{-1} 。其 95% 置信界上限 2.66×10^6 孢子 ml^{-1} ;

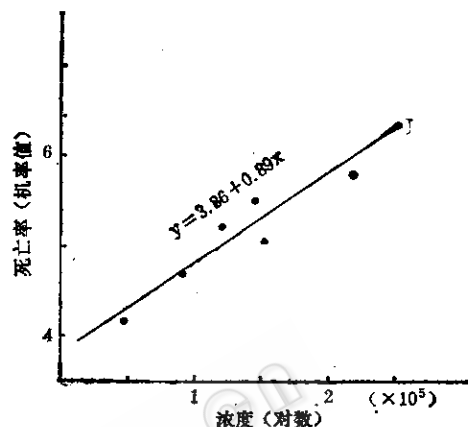


图 2 粉质拟青霉毒力回归图象

下限 1.69×10^6 孢子 ml^{-1} (图 2)。

田间小面积试验结果,用 1.2×10^7 , 6.0×10^6 , 3.0×10^6 孢子 ml^{-1} 三种浓度孢子悬浮液喷雾对菜蛾幼虫田间感病死亡率分别为 90.6%, 75.8%, 58.4%。对照为 0 [2,4]。

粉质拟青霉是一种毒力较强、寄主范围广泛的昆虫病原真菌。寄生半翅目、同翅目、鞘翅目、鳞翅目、双翅目等多种昆虫。国外分布于美、英、苏、德、法以及其他国家,是一种颇受重视的虫生真菌。

参 考 文 献

- [1] Brown A.H.S and Smith G.: *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 40(1): 17—89, 1957.
- [2] Doberski J.W.: *J. Invertebr. Pathol.* 37:188—194 1981.
- [3] 梁宗琦: *植物病理学报*, 11(4): 9—16, 1981.
- [4] © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

(上接第 199 页)

● **Coors-Synergen** 联合公司生产新产品核黄素: Synergen 公司开发采用酵母菌株生产核黄素的技术。该菌比其他菌生产率高,能与合成的维生素竞争。核黄素可作为饲料和食料的添加剂而广泛使用。Coors 公司将当作饲料或食品在市场出售, Synergen 公司索取年收率的 1%。

● **Pgizer** 公司申请许可出售重组凝乳酶: 该公司准备出售制造高级奶酪用的凝乳酶。这种酶通常从子牛的胃中抽提。美国食品药品监督管理局已批准该公司将凝乳酶作为食品添加剂的申请。此种酶当初是基因工程微生物的抽提物。该公司有实施权,他将独自开发生产技术。