

新蚜虫疔霉连续液体培养的菌丝生物量、产孢量及杀蚜毒力*

许 谦 冯明光**

(浙江大学微生物研究所 杭州 310029)

摘 要:继代培养常被疑为虫霉菌种毒力下降或某些生物学性状发生改变的原因之一。从研究新蚜虫疔霉(*Pandora neoaphidis*)固体平板菌落的液体培养获得的初始菌液出发,连续 6 次继代液培,测定了其在萨氏营养液中继代培养生产的菌丝生物量、产孢量及其对桃蚜(*Myzus persicae*)的毒力。在初始菌液生物量 8.8 mg/mL 和产孢量 7.2×10^5 孢子/mg 的条件下,以三种转接比(种液/营养液, v/v)连续 6 次继代培养,在 1/20 转接比下的菌丝生物量和产孢量分别为 6.4 ~ 10.0 mg/mL 和 7.3×10^5 ~ 10.8×10^5 孢子/mg,在 2/20 下为 5.7 ~ 8.5 mg/mL 和 10.0×10^5 ~ 12.1×10^5 孢子/mg,在 4/20 下为 5.5 ~ 10.9 mg/mL 和 6.4×10^5 ~ 10.9×10^5 孢子/mg。方差分析表明,继代培养对生物量和产孢量均无显著影响($P < 0.05$)。用初始菌液和 1/20 转接比下继代培养的菌液制备而成的接种体对桃蚜进行两组毒力测定,每一组测定的接种体为所有 7 批菌丝体产生的分生孢子,第二组测定只包括初始菌液、第 3 及第 6 次继代培养物。十批接种体在接种后第 3 ~ 7 d 对桃蚜的 LD_{50} 依次为 22.8 ~ 162.0、4.7 ~ 49.4、2.8 ~ 16.7、2.3 ~ 9.5 和 1.8 ~ 5.2 个孢子/mm²,其中第 7 d 的 LD_{50} 波动范围与其它虫霉菌株的 LD_{50} 波动范围相当。以上结果表明,本研究所采用的连续继代液培方法未引起新蚜虫疔霉的毒力衰退。

关键词:新蚜虫疔霉, 继代液体培养, 菌丝生物量, 产孢量, 毒力

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 03-0372-06

新蚜虫疔霉(*Pandora neoaphidis*)是世界性分布的杀蚜虫霉(虫霉目:虫霉科),常引发多种蚜虫种群的大规模流行病^[1-3]。虫霉的分生孢子一般不能直接发酵生产,而新蚜虫疔霉迄今尚无休眠孢子被发现,其应用主要通过将发酵生产的菌丝体施于田间或温室,使其产生并弹射出大量具侵染力的分生孢子而诱发蚜虫种群的流行病^[4-7]。目前,新蚜虫疔霉尚未成功应用于蚜虫的微生物防治,除缺乏合适的剂型外,发酵导致其生物学活性(菌丝产孢量和毒力)的下降也是重要因素^[4-6]。发酵过程是通过在一定转接比下的数次继代液体培养实现的,通过观察继代培养过程中新蚜虫疔霉菌丝体的产孢量和毒力变化,可明确发酵与该菌生物活性之间所存在的关系。现将我们对此问题的研究结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

新蚜虫疔霉菌株 F98028 于 1998 年在杭州从一自然感病的桃蚜(*Myzus persicae*)尸体

* 国家杰出青年科学基金(9525004)和国家自然科学基金(39870513)资助

** 联系作者

作者简介:许谦(1974-),男,浙江人,研究实习员,硕士,现从事杀虫微生物研究。

收稿日期:2000-07-06,修回日期:2000-12-28

上分离而得。该菌在 3℃ 和黑暗下保存于 OS-SDAY 斜面^[8]上,隔半年转接一次。

1.2 液体培养

将保存的斜面菌落转至牛奶-蛋黄培养基(SEMA)平板上,置于光照培养箱(15℃,L:D 12:12)中培养 21 d 后,将生长旺盛的菌丝块转入 50 mL 锥形瓶中的 30 mL 萨氏培养液(SDB;1% 酵母粉,1% 蛋白胨和 4% 葡萄糖),振荡培养(20℃,80 r/min)3 d,所得菌液作为继代培养的初始接种液(Sub 0)。初始接种液在 1/20、2/20 和 4/20 三种转接比(种液/培养液:V/V)下对 20 mL 萨氏培养液分别进行连续六次连接和振荡培养(20℃,80 r/min),三种转接比下的液培时间分别为 72 h、60 h 和 48 h,所得 1~6 代转接菌液分别示以 Sub 1、Sub 2,⋯,Sub 6。

1.3 菌丝生物量和产孢量的测定

每批次菌液取 10 mL 均匀涂布于 86 mm 水琼脂平板,用滤纸吸去多余水分。取 20 mm 盖玻片 5 枚,一枚置于皿盖中央,其余四枚距皿盖中心 35 mm 并依次间隔 90°。将此皿盖置于菌丝平板下方收集自上而下弹射出的分生孢子,每隔 8 h 换取盖玻片,在显微镜下抽样计数单位面积孢子数,具体方法依据文献^[9]。同时,另取 10 mL 菌丝液移至事先称重的滤纸上,用蒸馏水清洗 3 次后,在 50℃ 下烘干 3 h 后测定菌丝干重。

单位菌丝体产孢量(孢子/mg) C 的计算公式为 $C = D\pi r^2 / (VW)$,其中 D 为累计产孢浓度(孢子/mm²), r 为水琼脂平板半径, V 为菌液体积, W 为菌丝生物量(mg/mL)。

1.4 毒力测定

桃蚜饲养按许谦等^[10]的方法。生物测定分两组进行,第一组的接种体来自 1/20 转接比下继代培养所得菌液制备的菌丝产孢平板,包括 Sub 0~6 七批菌丝体;第二组只测定 Sub 0、Sub 3 和 Sub 6 的菌丝产孢平板。桃蚜接种采用“孢子浴”法^[9,11],即将 20 mL 菌液均匀涂布于 145 mm 水琼脂平板上,在 15℃ 及 L:D 12:12 下放置 24 h 后菌丝体平板即大量产孢,接种时每隔 1/4 时间旋转平板 90° 以使剂量均匀。每个测定包括 7~8 个剂量处理,通过控制孢子浴时间(0.1~0.2 min)而得,剂量范围 0.53~38.62 个孢子/mm²,每剂量 44~137 头二至三龄若虫。接种后蚜虫置于光照培养箱(20℃,L:D 12:12)中,逐日观察并取出蚜尸保湿,观察虫尸弹孢与否以确定死因,染病致死记录至接种后第 7 d。生测数据用时间-剂量-死亡率模拟方法进行分析^[9,11],用所获模型参数计算半致死剂量 LD₅₀ 和致死中时 LT₅₀。所有模拟和运算过程用 DPS 软件完成^[12]。

2 结果和讨论

2.1 继代培养的菌丝生物量和产孢量

新蚜虫病毒 F98028 在连续 6 次继代液培的菌体生物量见表 1。初始培养物的生物量为 8.84 mg/mL。在 1/20 转接比下六次继代液培的菌丝生物量为 6.40~10.00 mg/mL,在 2/20 转接比下为 5.70~8.52 mg/mL,在 4/20 转接比下为 5.50~10.44 mg/mL。

方差分析表明,不同转接比和转接次数对菌丝生物量并无显著影响(转接比: $F = 0.561, P = 0.587$;转接次数: $F = 0.299, P = 0.903$)。表 1 中数据与极易培养的暗孢耳霉(*Conidiobolus obscurus*) 24 h 发酵形成的生物量(7.50~11.25 mg/mL)^[13]相当。在相同培养条件下,达到最大生物量所需的时间较不稳定,甚至可相差 1 d^[4]。而连续转接则加剧了

这种不稳定性,因此在生产上,虫霉菌丝体合适的收获时间应通过定量取样监测予以确定。

表 1 新蚜虫痲霉 F98028 继代液体培养产生的菌丝体生物量

Table 1 The mycelial biomass of *P. neoaphidis* F98028 produced in subsequent liquid cultures

Inoculation ratio (V/V)	Mycelial biomass/(mg/mL)						
	Sub 0	Sub 1	Sub 2	Sub 3	Sub 4	Sub 5	Sub 6
1/20	8.84	6.90	7.64	6.40	8.90	7.04	10.0
2/20	8.84	8.00	7.64	6.12	8.52	6.80	5.70
4/20	8.84	6.76	7.64	8.72	5.50	10.44	9.84

根据表 1 数据和相应各处理产孢浓度计算的该菌继代培养的累计产孢量见表 2。初始培养物为 7.2×10^5 孢子/mg,在六次代培养过程中:1/20 转接比下为 $7.3 \sim 10.8 \times 10^5$ 个孢子/mg,2/20 转接比下为 $10.0 \sim 12.1 \times 10^5$ 个孢子/mg,4/20 转接比下为 $6.4 \sim 10.9 \times 10^5$ 个孢子/mg。

表 2 新蚜虫痲霉 F98028 继代培养菌丝体的产孢量

Table 2 Sporulation of *P. neoaphidis* F98028 mycelia produced in subsequent liquid cultures

Inoculation ratio (V/V)	No. conidia per milligram of mycelia, $\times 10^5$						
	Sub 0	Sub 1	Sub 2	Sub 3	Sub 4	Sub 5	Sub 6
1/20	7.2 ± 1.6	9.3 ± 1.1	10.8 ± 1.1	10.4 ± 1.8	7.3 ± 2.1	10.3 ± 3.2	8.6 ± 0.6
2/20	7.2 ± 1.6	11.4 ± 0.6	10.2 ± 0.4	10.3 ± 0.9	10.0 ± 1.6	12.1 ± 1.5	11.6 ± 1.7
4/20	7.2 ± 1.6	10.9 ± 1.3	6.9 ± 1.0	8.9 ± 1.4	6.4 ± 1.9	6.6 ± 0.4	8.0 ± 0.9

方差分析表明,转接次数对产孢无显著影响($F = 1.42, P = 0.298$),即继代培养不会导致产孢量变化;而转接比则有极显著影响($F = 8.45, P < 0.01$),转接比 2/20 最有利于产孢,而 4/20 最不利于产孢。由于虫霉对蚜虫的 LC_{50} 值一般仅 $1 \sim 50$ 孢子/ mm^2 ,而感染致死的蚜尸每头产孢数却多达 $4 \sim 50 \times 10^5$ ^[14],因而三种转接比对产孢的影响(1/20、2/20 和 4/20 转接比下的平均产孢量分别为 9.45×10^5 、 10.94×10^5 和 7.94×10^5 孢子/mg),在利用新蚜虫痲霉方面并不成为具有实质意义的考虑因素。从生产角度考虑,1/20 的转接比应是最佳选择。

2.2 继代培养所获接种体的毒力

在两组共 10 批接种对桃蚜进行生物测定,试虫死亡始见于第 2 d,死亡高峰一般出现在接种后第 3~6 d,染病蚜尸均呈典型虫痲霉致死症状。用时间-剂量-死亡率模型对所有生测数据进行模拟分析,均通过 Hosmer-Lemeshow 检验即模型拟合的异质性不显著(第一组: $C_0 = 13.30, P = 0.10; C_1 = 14.32, P = 0.07; C_2 = 12.03, P = 0.02; C_3 = 15.02, P = 0.06; C_4 = 12.20, P = 0.14; C_5 = 11.11, P = 0.20; C_6 = 14.54, P = 0.07$ 。第二组: $C_0 = 10.41, P = 0.24; C_3 = 13.59, P = 0.09; C_6 = 13.88, P = 0.08$)^[9,11],表明模型拟合良好。用所获各模型剂量效应参数 β 与时间效应参数 τ_j 的估计值计算出每批接种体对桃蚜在接种后不同时间的 LD_{50} 及其 95% 置信限^[15],详见表 3 所列。

表 3 继代培养的新蚜虫病霉菌丝体对桃蚜的逐日 LD₅₀ 及其 95% 置信限

Table 3 The estimates of LD₅₀s (associated 95% confidential intervals) of *P. neoaphidis* against *M. persicae* in bioassays with inocula from mycelia produced in subsequent liquid cultures

Inocula	LD ₅₀ with 95% confidential interval (No. conidia/mm ²)				
	day 3	day 4	day 5	day 6	day 7
Bioassay 1					
Sub 0	42.3(27.2 ~ 65.7)	14.6(11.1 ~ 19.1)	7.9(6.3 ~ 9.8)	5.6(4.5 ~ 6.9)	3.4(2.7 ~ 4.2)
Sub 1	162.0(69.0 ~ 380)	49.4(28.3 ~ 86.3)	16.7(11.8 ~ 23.5)	9.5(7.2 ~ 12.4)	5.2(4.1 ~ 6.7)
Sub 2	39.0(27.4 ~ 55.5)	4.7(3.7 ~ 5.9)	2.8(2.1 ~ 3.6)	2.3(1.8 ~ 3.1)	1.8(1.4 ~ 2.5)
Sub 3	66.9(31.0 ~ 144)	19.8(12.3 ~ 31.8)	15.1(9.9 ~ 23.1)	9.2(6.5 ~ 12.9)	5.2(3.8 ~ 7.1)
Sub 4	22.8(16.8 ~ 31.0)	10.2(8.2 ~ 12.6)	7.6(6.3 ~ 9.2)	4.3(3.6 ~ 5.1)	2.2(1.8 ~ 2.7)
Sub 5	23.5(14.9 ~ 37.0)	12.1(8.8 ~ 16.6)	7.0(5.4 ~ 9.2)	4.1(3.1 ~ 5.4)	2.1(1.4 ~ 3.0)
Sub 6	47.5(30.2 ~ 74.7)	13.7(10.3 ~ 18.0)	4.8(3.8 ~ 6.1)	2.7(2.0 ~ 3.4)	2.0(1.5 ~ 2.6)
Bioassay 2					
Sub 0	36.3(20.8 ~ 63.5)	8.9(6.5 ~ 12.2)	5.5(4.2 ~ 7.3)	4.2(3.2 ~ 5.5)	2.8(2.1 ~ 3.6)
Sub 3	23.5(15.7 ~ 35.2)	8.2(6.3 ~ 10.7)	6.4(5.0 ~ 8.2)	5.4(4.3 ~ 6.9)	4.7(3.7 ~ 5.9)
Sub 6	119.0(49.5 ~ 285)	20.3(12.8 ~ 32.2)	7.0(5.0 ~ 9.7)	3.2(2.3 ~ 4.6)	2.3(1.5 ~ 3.4)

在两组生测中,所有接种体在接种后第 3 d 对桃蚜的 LD₅₀ 为 22.8 ~ 162 个孢子/mm²,第 4 d 为 4.7 ~ 49.4 个孢子/mm²,第 5 d 为 2.8 ~ 16.7 个孢子/mm²,第 6 d 为 2.3 ~ 9.5 个孢子/mm²,第 7 d 为 1.8 ~ 5.2 个孢子/mm²。通过线性插值^[15]计算出各批接种体不同剂量下的 LT₅₀ 值(图 1),如在 10、20、30、40、50 及 60 个孢子/mm² 的剂量下,所有接种体对桃蚜的 LT₅₀ 分别为 3.6 ~ 5.8 d、3.1 ~ 4.8 d、2.9 ~ 4.4 d、2.8 ~ 4.2 d、2.7 ~ 4.0 d 和 2.6 ~ 3.8 d。

在两组生测中,所试新蚜虫病霉 F98028 菌株对桃蚜的 LD₅₀ 和 LT₅₀ 均未在连续继代培养过程中明显上升或下降,而是在一定范围内波动。所得数据波动幅度较大,主要与目前虫霉生测通常采用的孢子浴接种和剂量估计方法有关。因为在孢子浴过程中,从菌丝产孢平板落在蚜体上的孢子剂量是通过置放在一旁的盖玻片所收集的孢子数而估计的(因而虫霉生测的剂量常用单位面积孢子数表示),其随机

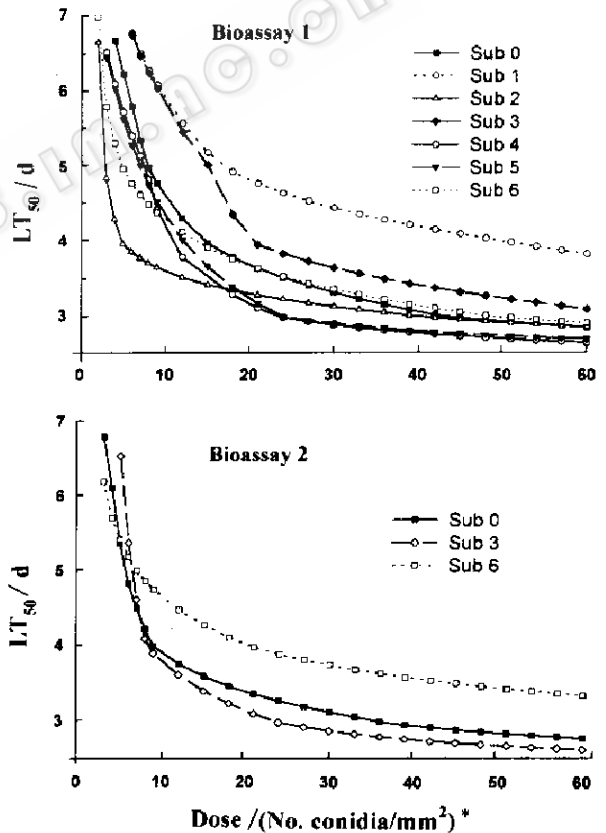


图 1 继代培养产生的新蚜虫病霉接种体对桃蚜的 LT₅₀

Fig. 1 The LT₅₀ estimates of *P. neoaphidis* against *M. persicae* after exposure to varying dosages of conidia from the mycelia produced in subsequent liquid cultures

*: The number of conidia per mm²

差异较难消除,且剂量越低(如 ≤ 2 孢子/ mm^2)误差越大(不同区域可相差数倍,未发表资料)。若菌株毒力较强, LD_{50} 值较小,则其误差增大。如根虫瘟霉(*Zoopthora radicans*)一菌株对云杉色卷蛾(*Choristoneura fumiferana*)的 LD_{50} 为11.21~18.77个孢子/ mm^2 ^[16];一新蚜虫病霉菌株对豌豆蚜(*Acyrtosiphon pisum*)的 LD_{50} 为1.2~3.9孢子/ mm^2 ^[6],另一菌株的 LD_{50} 为0.32~0.94孢子/ mm^2 ^[17],相差3倍左右。本实验中各接种体对桃蚜在第7d的 LD_{50} 最大相差2.85倍,与上述结果基本吻合。因此,我们认为新蚜虫病霉F98028的毒力未在六次继代液体培养中发生明显变化,而是在一个正常的范围内波动。

3 讨论

继代培养导致微生物各种生物学性状的衰退或变异,这一常见问题在虫霉研究中尤为突出,如毒力^[18,19]与产休眠孢子能力的下降^[20]及菌体形态特征的变化^[20]等。本实验结果表明,新蚜虫病霉F98028可以在萨氏培养液中连续继代培养而并不发生菌丝生物量、产孢量和毒力的变化。从20 mL的初始菌液出发,以1/20的转接比连续六次转接液培,理论上可获得 1.72×10^6 L菌丝液,这一体积远远超过了现有一般发酵罐的容量,也远超过一般田间试验所需的接种体量。因此,我们认为有关新蚜虫病霉菌丝体在发酵罐中大规模生产所出现的毒力和产孢能力下降的现象^[4-6],其原因并非源于菌种本身,而是发酵罐中一些特殊的因素所致(如通气量、pH值及发酵罐底部较高的液压等),菌丝体不加保护而直接喷洒,也会影响菌种的生物学活性。换言之,通过优化发酵工艺和剂型加工技术,大规模生产高杀虫活性的新蚜虫病霉菌丝体及其制剂是可能的。

参 考 文 献

- [1] Feng M G, Nowierski R E, Johnson J B. *J Appl Entomol*, 1992, **113**:376~390.
- [2] Remaudière G, Latgé J P. *Phytoprotection*, 1978, **59**:150~156.
- [3] Remaudière G, Latgé J P, Michel M F. *Entomophaga*, 1981, **26**:157~178.
- [4] Latgé J P, Silvie P, Papierok B, et al. Advantages and disadvantage of *Conidiobolus obscurus* and of *Erynia neoaphidis* in the biological control. In: Cavalloro R ed. *Aphid Antagonism*. Rotterdam, Holland: A A Balkema, 1983. 20~32.
- [5] Latteur G, Codefroid J. Trial of field treatments against cereal aphids with mycelium of *Erynia neoaphidis* (Entomophthorale) produced *in vitro*. In: Cavalloro R ed. *Aphid Antagonists*. Rotterdam, Holland: A A Balkema, 1983. 2~10.
- [6] Latteur G, Destain J, Codefroid J. Recherches sur la possibilite de produire *in vitro* une biopreparation à base de conidies ou de mycelium d'une entomophthorale pour lutter contre les pucerons des cereales. In: Cavalloro R, Piavaux A ed. *C E C Programme on integrated and biological control, 1979/1983, Final Report*. Luxembourg. Office for Official Publications of the European Communities. 1984. 407~416.
- [7] Silvie P, Dedryver C A, Tanguy S. *Entomophaga*, 1990, **35**:375~384.
- [8] Feng M G, Xu Q. *J Invertebr Pathol*, 2001, **77**: in press.
- [9] Feng M G, Liu C L, Xu J H, et al. *J Invertebr Pathol*, 1998, **72**:246~251.
- [10] 许 谦,冯明光,徐均焕,等. 菌物系统, 2000, **19**:241~247.
- [11] Feng M G, Johnson J B. *Environ Entomol*, 1991, **23**:338~345.
- [12] 唐启义,冯明光. 实用统计分析及其计算机处理平台. 北京:中国农业出版社, 1997. 253~257.
- [13] Latgé J P. *Can J Microbiol*, 1980, **26**:1038~1048.
- [14] Courtois P, Latteur G, Oger R. *Parasitica*, 1983, **39**:173~182.
- [15] Feng M G, Poprawski T J. *Subtrop Plant Sci*, 1999, **51**:36~38.

- [16] Vandenberg J S, Soper J S. *J Invertebr Pathol*, 1979, **33**: 148 ~ 154.
- [17] Oger R, Latteur G. *Parasitica*, 1985, **41**: 135 ~ 150.
- [18] Dumas J L, Papierok B. *Entomophaga*, 1989, **34**: 321 ~ 330.
- [19] Hajek A E, Humber R A, Griggs M H. *J Invertebr Pathol*, 1990, **56**: 91 ~ 97.
- [20] Glare T R. Ph. D. Dissertation, Australian National University, 1988, 1 ~ 187.

BIOMASS, SPORULATION AND APHID-INFECTING VIRULENCE OF *PANDORA NEOAPHIDIS* MYCELIA PRODUCED IN REPEATED LIQUID CULTURE *

Xu Qian Feng Mingguang

(Research Institute of Microbiology, College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: Repeated culture of entomophthoraceous isolates is a suspectable factor leading to their virulence decline of biological variation. In the present study, an isolate of *Pandora neoaphidis*, F98028, was repeatedly cultured six times at the regime of 20°C and 80 r/min in Sabouraud dextrose broth (SDB) at three inoculation ratio of 1/20, 2/20, and 4/20 (seed culture over fresh SDB). Mycelial biomass (MB), sporulation capacity (SC), and virulence to the green peach aphid, *Myzus persicae*, were assessed for each of the subcultures. The repeated liquid cultures, initiating from seed culture with MB 8.84 mg/mL and SC 7.22×10^5 conidia/mg, yielded MB and SC in a range of 6.4 ~ 10.0 mg/mL and 7.3×10^5 ~ 10.8×10^5 conidia/mg at the ratio of 1/20 (72h culture), 5.7 ~ 8.5 mg/mL and 10.0×10^5 ~ 12.1×10^5 conidia/mg at 2/20 (60 h culture), and 5.5 ~ 10.9 mg/mL and 6.4×10^5 ~ 10.9×10^5 conidia/mg at 4/20 (48 h culture), respectively. There was no significant difference in both MB and SC among the cultures ($F = 0.299$, $P = 0.903$) or the three inoculation ratios ($F = 0.561$, $P = 0.587$). Inocula from each of the cultures at the inoculation ratio of 1/20 were repeatedly bioassayed on the second and third instar colonies of *M. persicae*. Based on time-dose-mortality analysis, the estimates of LD_{50} s for all batches of the inocula were 22.8 ~ 162, 4.7 ~ 49.4, 2.8 ~ 16.7, 2.3 ~ 9.5, and 1.8 ~ 5.2 conidia/mm² 3 ~ 7 d after inoculation, respectively. All the estimates for the repeated cultures fell within a range previously reported. Thus, the method used for repeated liquid culture in this study did not cause a visible decline in the virulence of *P. neoaphidis* F98028.

Key words: *Pandora neoaphidis*, Repeated liquid culture, Mycelial biomass, Sporulation capacity, Virulence

* Chinese National Science Fund for Outstanding Youths (39525004)

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (39870513)