

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(2):211-221; 4 February 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

不同基质多代培养对蚧虫病原真菌蜡蚧霉致病力的影响

韩珍珍, 谢映平, 薛皎亮*, 樊金华

(山西大学生命科学学院, 太原 030006)

摘要:【目的】研究昆虫病原真菌蜡蚧霉 *Lecanicillium lecanii* (Zimmermann) 菌株 No. V3.4504 在不同培养基上继代培养, 对菌种的菌落生长特性、胞外酶活力和对蚧虫致病力的影响。【方法】试验菌种蜡蚧霉菌株 No. V3.4504 是从染病蚧虫上分离的。试验蚧虫是沙里院褐球蚧 *Rhodococcus sariuoni* Borchsenius 和日本龟蜡蚧 *Ceroplastes japonicus* Green。采用 7 种培养基继代培养多代。观察菌落形态特征、测定生长速率、产孢量、胞外蛋白酶和几丁质酶活性及对蚧虫的致死率。【结果】在 PDA 培养基上, 菌落生长速率最快, 但产孢量最低, 胞外蛋白酶和几丁质酶的活性均呈逐代下降趋势, 对两种蚧虫致死率也最低; 增加蛋白胨对改善菌种致病力没有明显效果; 在增加蚧虫尸体的 D、E、F 培养基上, 菌落生长速率虽然较慢, 但产孢量上升为 $8.83 \times 10^6 - 9.13 \times 10^6$ 孢子/cm²。蛋白酶和几丁质酶的活性平均达到 2.16 - 2.13 U/g 和 1.01 - 1.03 U/g, 对两种蚧虫的致死率分别在 55% - 58% 和 39% - 42%; 在活蚧虫上连续培养 3 代, 蛋白酶和几丁质酶的活性最高, 为 3.08 - 2.92 U/g 和 1.45 - 1.42 U/g, 是 PDA 培养基上的 1.6 倍。对两种蚧虫的致死率也最高, 分别达到 71.30% 和 58.89%。蛋白酶和几丁质酶的活性与蚧虫死亡率呈正直线相关关系。【结论】采用 PDA 培养基连续多代培养会引起菌株 No. V3.4504 明显退化; 在培养基中加入蚧虫尸体, 对于保持菌种活力有明显效果; 在活蚧虫体上继代培养对复壮菌种, 提高菌种毒力的效果最佳。

关键词: 昆虫病原真菌; 蜡蚧霉; 蚧虫; 胞外蛋白酶; 几丁质酶

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 02-0211-11

蚧虫又称介壳虫, 在分类上属昆虫纲 Insecta、半翅目 Hemiptera、蚧总科 Coccoidea, 全世界已记录 25 科 7500 种^[1], 我国记录 700 多种。它们分布广, 寄主多, 是农林、果木和花卉的重要害虫。蚧虫在自然界中的病原菌相对较少, 目前记录最重要的是蜡蚧霉 *Lecanicillium lecanii* (Zimmermann), 它属于子囊菌门 Ascomycota, 粪菌纲 Sordariomycetes, 肉座菌目 Hypocreales, 麦角菌科 Clavicipitaceae^[2], 是一种地理分布和寄主范围比较广泛的昆虫病原真菌, 而被国内外普遍关注。此菌最早由 Nivter 于 1861 年在锡兰发现寄生咖啡蜡蚧 *Lecanii coffeae*, 从上世纪以来, 已在世界很多地方发现其寄生蚧科 Coccidae、

盾蚧科 Diaspididae、粉蚧科 Pseudococcidae、珠蚧科 Margarodidae 的 40 多种蚧虫, 但是, 目前蜡蚧霉仍主要用于防治蚜虫、粉虱和螨类, 在蚧虫上的应用却很少^[3-4]。

为了开发蜡蚧霉作为生物制剂用于蚧虫的生物防治, 我们实验室研究了日本龟蜡蚧 *Ceroplastes japonicus* Green 感染蜡蚧霉后的组织病理变化^[5] 和蜡蚧霉入侵沙里院褐球蚧 *Rhodococcus sariuoni* Borchsenius 表皮过程中, 蛋白酶和几丁质酶的作用^[6], 发现蛋白酶在菌丝侵染体壁的前期发挥作用, 降解表皮中的蛋白质, 使几丁质暴露, 诱导几丁质酶的大量产生, 从而分解几丁质。这与白僵菌等

基金项目: 国家自然科学基金 (30671693) 和山西省留学基金 ([2007]13)

* 通信作者。Tel: +86-351-7018092; E-mail: xuejl@sxu.edu.cn

作者简介: 韩珍珍 (1984 -), 女, 山西人, 硕士研究生, 主要研究方向为昆虫病原真菌。E-mail: hanzhenzhen1023@126.com

收稿日期: 2009-10-12; **修回日期:** 2009-11-26

虫生真菌感染昆虫的致病机理有很多相似之处。昆虫病原真菌导致昆虫染病和死亡主要是通过感染和穿透寄主体壁,然后进入体腔的。昆虫体壁是它侵入过程的主要障碍,当虫生真菌分生孢子在寄主昆虫体壁表面附着萌发,形成芽管和菌丝,其端部形成侵入钉,其入侵体壁一方面依靠侵入钉的机械压力,同时依靠菌体分泌的胞外酶对体壁化学物质的分解作用,其中最主要的是胞外蛋白酶和几丁质酶,因为构成昆虫体壁主要成分是蛋白质(55% - 80%)、几丁质(17% - 50%)和脂类等^[7]。一些研究还发现,白僵菌感染寄主的过程中菌丝分泌的胞外蛋白酶、几丁质酶和脂肪酶结合在一起才能打开昆虫表皮,而单种酶不行^[8-9]。蜡蚧霉感染粉虱和蚜虫等昆虫,也是由于蜡蚧霉能合成一些具有水解作用的蛋白酶和几丁质酶等酶类^[10-11]。

在应用昆虫病原真菌作为生物制剂防治害虫过程中,普遍存在连续多代人工培养后菌种退化、毒力降低的问题。彭国雄等报道了球孢白僵菌不同世代菌株总胞外蛋白酶与毒力相关性,随着世代数的增加,Pr1 和总胞外蛋白酶产生水平及对家蚕的毒力都明显下降^[12]。李会平等运用平板法简单的分析了不同基质传代后,白僵菌菌株胞外蛋白酶和几丁质酶产生水平及对桑天牛幼虫毒力的关系,指出通过桑天牛幼虫传代的白僵菌菌株比通过普通查氏培养基传代的菌株具有更强的产酶能力,而且随着继代培养它的毒力存在着退化的现象,主要表现在胞外蛋白酶和几丁质酶等活性下降^[13]。但关于蜡蚧轮枝菌在不同基质传代中菌种的生长状况、胞外酶活性和对蚜虫致病力的变化情况还未见报道。本文用从蚜虫体上分离的蜡蚧霉菌株 No. V3. 4504 在 7 种培养基上连续多代培养,研究不同培养基和连续继代培养对其菌落特征、生长速率、产孢量、胞外蛋白酶和几丁质酶活性,以及对沙里院褐球蚧和日本龟蜡蚧感染效果的影响。希望为探讨菌种退化和菌种复壮,保持菌种毒力和高感染活性提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和蚧虫: 试验菌种: 试验菌种为蜡蚧霉 *Lecanicillium lecanii* (Zimmermann.), 购于中国科学院微生物研究所国家菌种保藏中心。菌株编号: No. V3. 4504, 从蚧虫上分离获得(寄主蚧虫种名不详)。

试验蚧虫: (1) 沙里院褐球蚧 *Rhodococcus*

sariuoni Borchsenius (半翅目: 蚧科) 雌成虫, 2008 年 4 月中旬采集于太原市南坪头村的苹果园, 寄主苹果树。(2) 日本龟蜡蚧 *Ceroplastes japonicus* Green (半翅目: 蚧科) 雌成虫, 2008 年 2 月采集于山西夏县柿树园, 寄主柿树。采集时蚧虫的虫体密集固着在寄主枝条上, 用枝剪将枝条连同蚧虫一并剪下, 放于 4℃ 冰箱保存备用。

1.1.2 主要仪器和试剂: (1) 仪器: SpectraMax M5 酶标仪; 冷冻离心机 (Eppendorf 58042); MODEL868 pH 分析仪 (Thermo Orion 公司); HH · SK 恒温水浴锅 (北京华恒万仪仪器有限公司); SYQ · ZDX-35BI 型自动座式压力蒸汽灭菌器 (上海申安医疗器械厂); 磁力搅拌器 (常州国华电器有限公司); SW-CJ-1K 型超净台 (苏州净化设备有限公司), 水浴摇床 (苏州威尔实验用品有限公司)。(2) 试剂: 四硼酸钾, 三氯乙酸, 二甲氨基苯甲醛 (DMAB), Na₂CO₃ 为天津市科密欧化学试剂有限公司产品; 95% 乙醇, 为天津天新精细化工开发中心产品; 酪氨酸, 酪蛋白, 粉状几丁质, N-乙酰氨基葡萄糖均为 Sigma 公司产品; 冰醋酸为无锡市化学试剂厂产品。

1.2 不同基质培养基的制备和菌种的连续多代培养

7 种培养基制备: (A) PDA 培养基; (B) PDA 培养基 + 蛋白胨 10 g/L; (C) PDA 培养基 + 蛋白胨 10 g/L + 沙里院褐球蚧虫尸 30 g/L; (D) PDA 培养基 + 沙里院褐球蚧虫尸 30 g/L; (E) PDA 培养基 + 日本龟蜡蚧虫尸 30 g/L; (F) PDA 培养基 + 混合虫尸 30 g/L (沙里院褐球蚧和日本龟蜡蚧虫尸各 15 g/L); (G) 以沙里院褐球蚧 (G-p) 和日本龟蜡蚧 (G-r) 的活虫体作基质培养。

菌种多代培养: 在上述 A-F 共 6 种培养基分别接种, 连续培养 9 代。得到各代培养的菌种, 备用。采用两种蚧虫的活虫体作基质 (G) 的接种和培养方法是, 将固着在枝条上的沙里院褐球蚧及日本龟蜡蚧雌成虫连同枝条 (5 cm 长), 在菌种孢子浓度为 7×10^7 孢子/mL 的悬浮液中浸没 15 s 接种, 接着用镊子将他们放在滤纸上吸干, 然后放入培养皿 (9 cm × 2 cm), 置于培养室 (25 ± 1℃, RH75%) 培养 6 d, 每天用 OLYMPUS 体式显微镜观察并记录, 直至虫体干瘪死亡长满菌丝。然后把蜡蚧霉从染病虫体上分离纯化, 制成孢子悬浮液继续感染活虫体, 再从感病的虫体上分离纯化菌种, 连续 3 代这样分离纯化培养, 得到第 3 代的菌种, 在沙里院褐球蚧上的菌种记为 G-p3, 在日本龟蜡蚧上得到的菌种记为

G-r3。

1.3 菌株在不同基质培养基上的生长特性观察

菌落观察:将菌株 No. V3. 4504 在 PDA 上培养 1 代后作为种菌,制备成浓度为 1×10^8 孢子/mL 的孢子悬浮液,在无茵条件下,使用微量移液枪将悬浮液 5 μ L 点接在已经制备好的 6 种培养基(A-F)的培养皿上,每皿点接三点,呈等腰三角形,盖好皿盖,置培养室培养 10 d,试验为 3 个重复。每隔 2 d 作 1 次观察。观察菌落形态特征,测定菌落生长速率及产孢量。用游标卡尺测量菌落直径(mm),每个菌落重复测量 3 次,计算其平均值。产孢量计算方法是,在菌落核心的 1/2 处用直径为 4.5 mm 打孔器打孔取样,在 10 mL 0.1% 吐温-80 溶液中回旋振荡 15 min 成孢子悬浮液,然后用血球计数板在显微镜下计数,根据公式:样品孢子数/cm² = 80 个小方格的总孢子数/80 \times 4000000 \times 10,计算出产孢量。数据统计采用 SPSS 软件对菌种各代之间和各培养基之间都进行 Duncan 多重比较分析。

1.4 胞外蛋白酶和几丁质酶的诱导培养和活性测定

菌种孢子悬浮液的制备:将上述连续多代培养得到的菌种分别从平板上接种到斜面 PDA 培养基上培养 7 d 后,然后用灭菌的 0.1% 吐温-80 溶液洗脱分生孢子,在磁力搅拌器上搅拌 3h,用无菌纱布滤掉菌丝体,用血球计数板在显微镜下计数分生孢子浓度,将其全部配置成孢子浓度为 7×10^7 孢子/mL 的悬浮液备用。

胞外蛋白酶诱导培养和活性测定:菌种胞外蛋白酶诱导培养用得到各菌株浓度为 7×10^7 孢子/mL 的孢子悬浮液,按 1% 的接种量分别接入到液体培养基中(含有 1% 的明胶(w/v),NaCl 0.3 g/L, K₂HPO₄ 0.3 g/L, MgSO₄ 0.3 g/L, 各组分溶于 pH7.0 的 0.2 mol/L 的磷酸缓冲液),置 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 150 r/min 的旋转式摇床上连续培养 10 d,根据需要分别取样测定胞外蛋白酶的活性。蛋白酶活性测定采用 Folin 试剂法并参照彭国良等的方法^[6],仪器用酶标仪,测定 680 nm 处吸光值。

胞外几丁质酶诱导培养和活性测定:同样取上述各菌株浓度为 7×10^7 孢子/ml 的孢子悬浮液,按 1% 的接种量分别接入到含有 NH₄NO₃ 3 g/L, KH₂PO₄ 2 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.6 g/L, FeSO₄ · 7H₂O 0.1 g, 胶体几丁质 5 g/L 的液体培养基中,

$25 \pm 1^\circ\text{C}$, 150 r/min 的旋转式摇床培养,连续 10 d。分别取样测定胞外几丁质酶的活性,胞外几丁质酶的活性测定根据曹广春的方法^[14],用酶标仪测定,波长 585 nm。

1.5 菌株对两种蛭虫的致死率

选沙里院褐球蛭和日本龟蜡蚧虫体密度较大的枝条,剪成 7-8 cm 左右的长度。用上述 7 种基质上连续培养 3 代获得的菌种,分别配制成 5×10^7 孢子/mL 孢子悬浮液,用喉头喷雾器给附着蛭虫的枝条上喷雾接种,达到滴水为度。每组蛭虫 60 头,设 3 个重复,对照组只用 0.1% 的吐温-80 无菌水喷雾,喷雾处理后自然风干约 3 分钟,分别放于培养盒,置于培养室($25 \pm 1^\circ\text{C}$, RH 75%)连续培养 10 d。每天观察记录两种蛭虫的感病情况,当整个虫体长满菌丝,虫体腹面干扁,记为死亡。采用 SPSS 软件对不同处理间进行 Duncan 多重比较分析。

2 结果和分析

2.1 不同培养基对蜡蚧霉菌落形态特征的影响

在 6 种培养基上继 9 代培养后,观察到蜡蚧霉菌株 No. V3. 4504 的在不同培养基上菌落的色泽和形态特征发生了变化(图 1),在 PDA 培养基(A)上,菌落(图 1-A)的色泽灰白,中央棉絮状凸起呈帽状结构,边缘气生菌丝徒长,比较稀疏,向四周呈辐射状分散,占整个菌落的 1/2,孢子层较薄;添加蛋白胨的培养基(B)色泽淡黄,菌落(图 1-B)呈乳白色,毛毡状,菌落层较厚,致密,中央形成小的突起,并由中央向四周呈辐射状分布。在培养基中同时加入蛋白胨和沙里院褐球蛭虫尸,培养基(C)为黑褐色,菌落特征与培养基(B)上的相似,但其菌落的中央突起和向四周呈辐射状更加明显;添加沙里院褐球蛭虫尸的培养基(D)呈黑褐色,添加日本龟蜡蚧虫尸的培养基(E)呈现褐色,或同时添加这两种蛭虫虫尸(F)的培养基上呈灰褐色,在它们上面的菌落(图 1-D、E 和 F)都呈白色,绒毛状,质地较均匀,致密,孢子层厚。其中在培养基(D)上的菌落最好,中央呈现同心环结构,在培养基(F)上的中央区稍微突起。总体上说,单独添加沙里院褐球蛭虫尸的培养基(D)和添加日本龟蜡蚧虫尸的培养基(E)上,蜡蚧霉菌落比较稳定,变异程度小,质地均匀,致密,孢子层厚。说明这样的培养基适合菌种的人工培养。

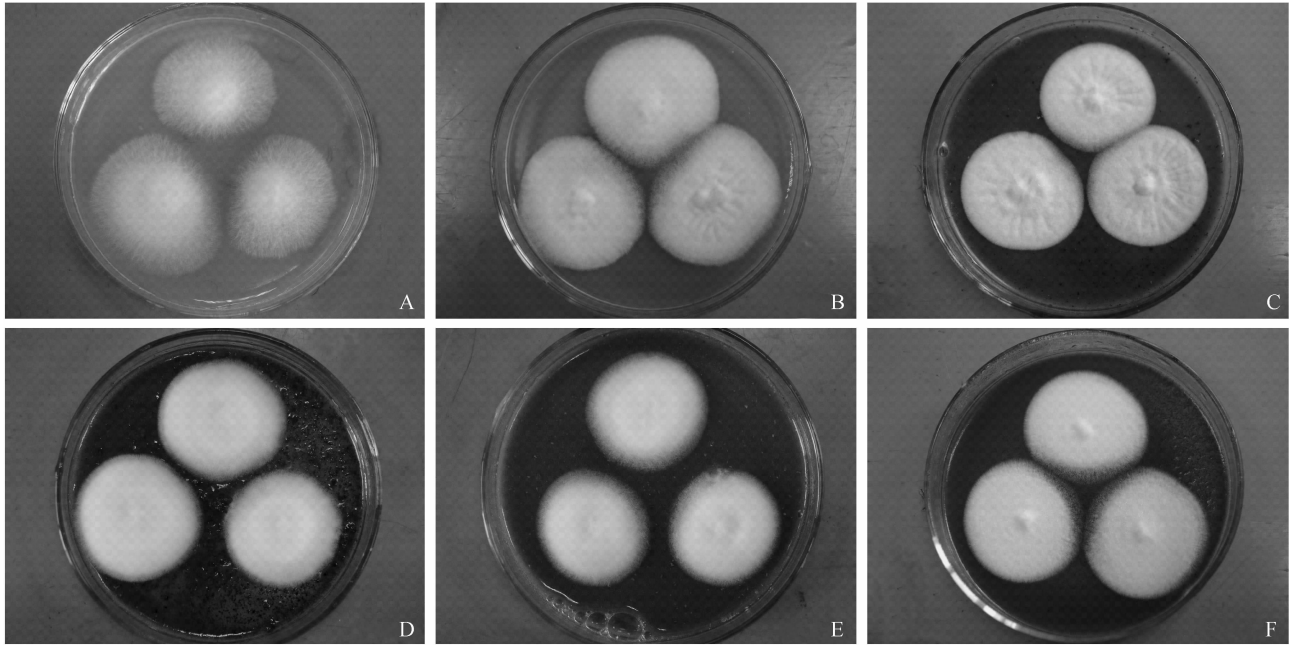


图1 蜡蚧霉菌株 No. V3.4504 在 6 种培养基上的菌落形态特征

Fig. 1 Colonial morphological characteristics of the stain No. V3.4504 of *Lecanicillium lecanii* cultivated on the different six media.

2.2 不同培养基对蜡蚧霉菌落生长速率及产孢量的影响

蜡蚧霉在 6 种不同的培养基上继 9 代培养,分

别测定隔代菌落的生长速率及产孢量,结果显示,在各培养基上,随着培养代数的增加,菌落的生长速率呈连续增加趋势(表 1),其中第 7 代与第 1 代差异

表 1 蜡蚧霉菌株 No. V3.4504 在 6 种培养基上 1-9 代菌落的生长速率 (mm/d)

Table 1 The colonial growth rate (mm/d) of the stain No. V3.4504 of *L. lecanii* from its 1st to 9th generation cultivated on the six media

Generation	Media					
	A	B	C	D	E	F
1	2.48 ± 0.17c	2.26 ± 0.25c	2.13 ± 0.14c	1.98 ± 0.28c	1.95 ± 0.35c	2.16 ± 0.26c
3	2.59 ± 0.12bc	2.55 ± 0.11b	2.38 ± 0.10b	2.22 ± 0.17bc	2.05 ± 0.13bc	2.34 ± 0.19bc
5	2.63 ± 0.033abc	2.59 ± 0.18ab	2.51 ± 0.06b	2.47 ± 0.15ab	2.39 ± 0.24abc	2.49 ± 0.12abc
7	2.89 ± 0.07ab	2.61 ± 0.03ab	2.61 ± 0.17ab	2.52 ± 0.06ab	2.55 ± 0.13ab	2.56 ± 0.07ab
9	2.98 ± 0.13a	2.86 ± 0.06a	2.82 ± 0.094a	2.71 ± 0.34a	2.72 ± 0.486a	2.78 ± 0.27a
mean	2.71	2.58	2.49	2.38	2.33	2.47
<i>P</i> < 0.05	a	ab	bc	cd	d	bc

Data with different small letters in the same column are significantly different among generations ($P < 0.05$). In the last row, different small letters mean significant difference among media ($P < 0.05$). The same below.

表 2 蜡蚧霉菌株 No. V3.4504 在 6 种培养基上 1-9 代菌落的产孢量 ($\times 10^6$ 孢子/ cm^2)

Table 2 The colonial spore production ($\times 10^6$ spore/ cm^2) of the stain No. V3.4504 of *L. lecanii* from its 1st to 9th generation cultivated on the six media

Generation	Media					
	A	B	C	D	E	F
1	5.28 ± 0.42a	5.85 ± 0.61a	6.29 ± 0.38a	7.84 ± 0.55a	7.56 ± 0.30a	7.68 ± 0.28b
3	4.28 ± 0.13b	4.93 ± 0.26ab	6.58 ± 0.74a	8.83 ± 0.69a	8.68 ± 0.48a	9.13 ± 0.36a
5	3.75 ± 0.33bc	4.67 ± 0.75ab	5.77 ± 0.70ab	8.04 ± 0.71a	7.88 ± 0.36a	7.52 ± 0.62b
7	3.10 ± 0.59c	4.10 ± 0.65b	4.68 ± 0.68b	6.55 ± 0.13b	6.13 ± 0.21b	5.98 ± 0.30c
9	2.95 ± 0.61c	3.08 ± 0.83b	3.33 ± 0.71c	5.47 ± 0.72b	4.92 ± 0.65b	4.35 ± 0.70d
mean	3.87	4.53	5.33	7.35	7.03	6.93
<i>P</i> < 0.05	d	c	b	a	a	a

显著,第9代与第1代差异极显著。在添加蛋白胨的培养基(B)和(C)上第1代和第3代之间呈现显著差异。在PDA培养基(A)上的生长速度最快,9代的平均生长速率为2.71 mm/d,与添加虫尸的4种培养基之间均有显著差异,其中与添加日本龟蜡蚧虫尸的培养基(E)之间差异达极显著水平;在添加蛋白胨的2种培养基(B)和(C)上菌落的生长速率较快,平均值分别为2.58 mm/d和2.49 mm/d;在单独添加沙里院褐球蚧虫尸培养基(D)或日本龟蜡蚧虫尸培养基(E)上的菌落生长速率最小,平均值分别为2.38 mm/d和2.33 mm/d。

从表2可见,在各培养基上继代培养对菌种的产孢量也有明显影响,从总体上看随着继代培养的增加产孢量呈下降趋势。在PDA培养基(A)上,第3代和第1代之间就出现显著差异,到第7代其差异达极显著水平,到第9代其产孢量最低,仅有 2.95×10^6 孢子/cm²;在添加蛋白胨的培养基(B)和(C)上,到第7代才和第1代之间出现显著差异,到第9代的产孢量也只有 3.08×10^6 和 3.33×10^6 孢子/cm²;但在添加虫尸的3种培养基D、E、F中,产孢量在第1代到第5代之间维持在高的水平,其最高值分别达到 8.83×10^6 孢子/cm²、 8.68×10^6 孢子/cm²、 9.13×10^6 孢子/cm²。到第7代和第9代产孢量虽然出现显著差异,但与培养基A、B、C上的相比还是明显较高。在6种培养基之间比较,单独添加虫尸的培养基D、E、F上产孢量之间的差异不显著,属于第一类,9代平均值分别为 6.93×10^6 孢子/cm²、 7.03×10^6 孢子/cm²、 7.35×10^6 孢子/cm²,比培养基A、B、C上的高,差异达显著和极显著水平;在A、B、C 3种培养基之间产孢量也达到差异显著水平,以PDA培养基上的产孢量最低,平均仅有 3.87 孢子/cm²。

由以上结果看出,随着继代培养,菌落的生长速率会逐代的增加,但产孢量却在下降;在PDA培养上表现最为明显;在培养基中加入蛋白胨对阻止菌丝徒长和提高产孢量有一定的效果,但在培养基中分别加入两种蚧虫尸体对于保持高的产孢量及防止菌丝徒长效果最好。

2.3 蜡蚧霉菌株 No. V3.4504 第1代蛋白酶和几丁质酶活性的变化趋势

为了比较蜡蚧霉菌株 No. V3.4504 在我们设计的7种培养基上连续多代培养后,蛋白酶和几丁质酶活性的变化,我们先用诱导培养后的第1代菌种作为基础,测定了第1代菌种在10 d中两种酶活

培养过程中的变化趋势。结果发现(图2),蛋白酶在前6 d一直呈现快速增长的趋势(图2-A),且每天的增长速率差异显著,第5天酶活达到 1.24 ± 0.45 U/g,在第6天达到最高值 1.99 ± 0.07 U/g,增加了1.61倍。第6天后酶的活性开始降低,到第10天降为 1.45 ± 0.05 U/g;几丁质酶与蛋白酶有相似的变化趋势(图2-B),在前7 d也呈现快速增长,在第6天几丁质酶活达到 0.60 ± 0.02 U/g,在第7天几丁质酶活达到最高值 0.92 ± 0.13 U/g,是第6天的1.53倍。然后酶活性急剧降低,第10天酶活降低为 0.45 ± 0.14 U/g。

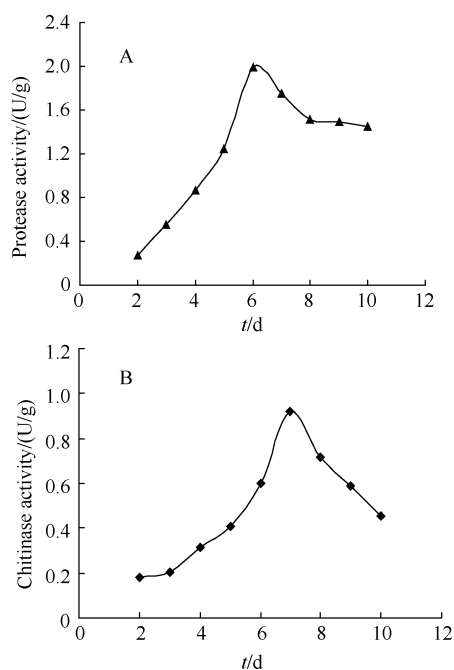


图2 菌株 No. V3.4504 的蛋白酶(A)和几丁质酶(B)活性随培养时间的变化趋势

Fig. 2 Protease activities (A) and chitinase (B) activities trend of strains No. V3.4504 with cultivation time.

2.4 蜡蚧霉菌株 No. V3.4504 各代蛋白酶和几丁质酶活性的比较

用上述A、B、C、D、E、F的6种培养基分别对蜡蚧霉菌株 No. V3.4504 进行连续9代的继代培养,分别测定比较它们在1、3、5、7、9代的蛋白酶和几丁质酶活性。根据上述图2A显示在10 d的培养中,蛋白酶活性在第6天为最高值和图2-B显示几丁质酶活性在第7天最高值的试验结果,选择蛋白酶活性测定在第6天采样,几丁质酶活性测定在第7天采样。测定结果发现,6种培养基中,添加蚧虫尸体的D、E、F 3种培养基上蜡蚧霉菌株 No. V3.4504 的胞外蛋白酶活性最高,平均值分别为2.16 U/g、

2.18 U/g、2.16 U/g,它们之间的差异不显著,但与其他培养基之间的差异显著。同样,在D、E、F培养基上菌株的胞外几丁质酶活性也最高,分别达到1.01、1.03、1.01 U/g,与其他培养基之间的差异显著;在A、B各培养基上菌株的胞外蛋白酶活性平均值分别是1.78 U/g和1.80 U/g,几丁质酶活性平均值分别是0.79 U/g和0.87 U/g,2种培养基之间差异不显著。从图3-A和3-B中可以看到,菌株在添加虫尸的培养基C、D、E、F上培养3代后与第1代比较,菌株蛋白酶和几丁质酶活性都呈现明显增长

趋势,而在没有添加虫尸的A、B培养基上都呈现下降趋势。尽管菌株在6种培养基上5、7、9代的蛋白酶和几丁质酶活性随着代数的增加都呈现下降趋势,但是相比添加虫尸培养基而言,A、B两种培养基上的各代菌株酶活性下降的趋势相对较快,在A培养基上其蛋白酶活性从第1代的1.99 U/g降低到第9代的1.56 U/g,降低了22%,几丁质酶活性从第1代的0.92 U/g降低到第9代0.65 U/g,降低了30%。

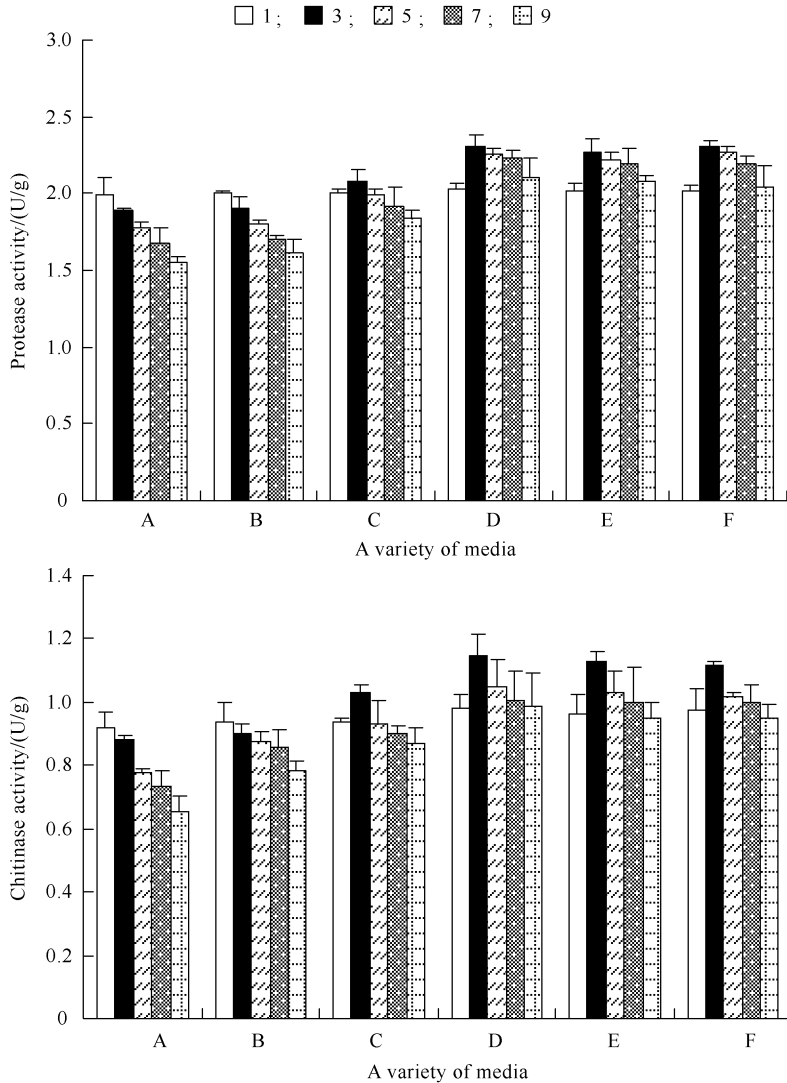


图3 菌株 No. V3.4504 在不同培养基上各代蛋白酶活性(A)和几丁质酶活性(B)的比较

Fig. 3 Comparison of protease activities (A) and chitinase activities (B) of the strain No. V3.4504 between generations and in different media. 1,3,5,7 and 9 represented the generation number.

2.5 菌种在蚱虫活体上连续培养的蛋白酶和几丁质酶活性与在其他培养基上的比较

在上面的试验已经知道,在A-F不同基质的6种培养基上连续9代培养蜡蚱霉,发现增加蚱虫尸

体的培养基上第3代菌株的蛋白酶和几丁质酶活性最高。采用活蚱虫作为基质培养蜡蚱霉,连续培养3代,比较它们与在其他6种培养基上的菌种蛋白酶和几丁质酶活性。结果发现(表3),在活蚱虫体

上连续培养 3 代,其蛋白酶和几丁质酶的活性最高,与其他培养基上的相比差异显著。其中菌种在沙里院褐球蚱上的 G-p3 与日本龟蜡蚱上 G-r3 上培养的蛋白酶活性分别为 3.08 U/g 和 2.92 U/g,是 PDA 培养基上的 1.6 倍。在增加蚱虫尸体成分的培养基 C、D、E 和 F 上培养 3 代后,菌种的蛋白酶和几丁质酶的活性属于第 2 类。而蛋白酶和几丁质酶活性最低的是在 PDA 培养基上或 PDA 培养基加蛋白

胨的。

由此看出,采取活体继代培养对复壮菌种,增加菌种的胞外蛋白酶和几丁质酶活性,提高菌种的毒力,效果最好;在培养基中加入蚱虫尸体也有明显效果;连续采用 PDA 培养基连续多代扩大繁殖菌种,会明显降低其蛋白酶和几丁质酶活性,使菌种退化;在 PDA 培养基中加入蛋白胨对改善菌种胞外酶活力没有明显作用。

表 3 菌株 No. V3.4504 在不同基质继 3 代后蛋白酶和几丁质酶活性比较

Table 3 Comparison of protease activities and chitinase activities of the strain No. V3.4504 successive three generation cultivated on different media

Strain	Protease activity	Significant difference (<i>P</i> < 0.05)	Chitinase activity	Significant difference (<i>P</i> < 0.05)
	/(U/g)		/(U/g)	
A-3	1.89 ± 0.11	c	0.88 ± 0.01	c
B-3	1.90 ± 0.07	c	0.90 ± 0.03	c
C-3	2.08 ± 0.08	bc	0.93 ± 0.03	b
D-3	2.30 ± 0.08	b	1.15 ± 0.08	b
E-3	2.27 ± 0.08	b	1.13 ± 0.03	c
F-3	2.31 ± 0.03	b	1.12 ± 0.01	b
G-p3	3.08 ± 0.12	a	1.45 ± 0.05	a
G-r3	2.92 ± 0.05	a	1.42 ± 0.04	a

In the same column, different small letters mean significant difference among strains (*P* < 0.05).

2.6 不同培养基上继 3 代后菌种对两种蚱虫的致死率比较

采用上述蜡蚧霉在不同培养基上连续 3 代培养后的菌种制备孢子悬浮液,孢子浓度 5×10^7 孢子/

mL,喷雾处理沙里院褐球蚱和日本龟蜡蚱雌成虫,在实验室连续培养 10 d,从第 3 天开始观察记录死亡虫数,计算出死亡率(表 4 和表 5)。结果显示,染菌后两种蚱虫在第 3 天开始出现死亡,直到第 5 天

表 4 沙里院褐球蚱的逐日死亡率

Table 4 Mortality of *Rhodococcus sariuoni* infected by the strain No. V3.4504 cultured on different media

Strain	Scale number(n)	Corrected mortality/%								Cumulative deaths (n)
		3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	
A-3	180	0.56	2.40	4.44	11.29	24.81	32.22	42.60	50.56	99 ± 9.17c
B-3	180	0.74	2.58	4.63	11.66	26.3	33.89	43.33	53.34	104 ± 2.65bc
C-3	180	1.11	3.70	5.74	12.77	27.41	34.44	44.26	56.48	110 ± 9.61bc
D-3	180	1.48	3.88	6.48	13.89	27.97	36.48	45.55	58.89	114 ± 4.00b
E-3	180	0.74	3.33	5.00	12.59	27.04	34.26	43.89	55.19	107 ± 6.66bc
F-3	180	1.11	2.59	5.73	12.23	25.00	34.82	44.28	56.48	110 ± 2.65bc
G-p3	180	1.80	4.25	6.66	17.59	37.41	46.66	55.28	71.30	136 ± 2.31a

Data with different small letters in the same column are significantly different among generations (*P* < 0.05). The same below.

表 5 日本龟蜡蚱的逐日死亡率

Table 5 Mortality of *Ceroplastes japonicus* infected by the strain No. V3.4504 cultured on different media

Strain	Scale number(n)	Corrected mortality/%								Cumulative deaths (n)
		3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	
A-3	180	0.00	1.48	2.04	6.66	12.78	25.00	30.38	34.81	69 ± 2.31d
B-3	180	0.00	1.67	2.59	7.03	14.26	28.52	32.22	35.56	70 ± 1.00d
C-3	180	0.37	1.67	2.22	6.11	13.89	29.00	32.40	37.78	74 ± 5.29cd
D-3	180	0.37	1.85	2.96	7.03	14.63	29.26	33.89	39.45	77 ± 4.00bc
E-3	180	1.11	2.41	3.33	8.88	15.93	32.96	36.96	42.23	82 ± 2.65b
F-3	180	0.56	1.85	2.78	6.66	13.70	28.15	34.26	39.63	77 ± 2.08bc
G-r3	180	1.29	2.96	6.11	11.85	25.19	39.26	47.78	55.92	106 ± 2.89a

死亡率都较少。从第 6 天和第 7 天就出现大量死亡,使死亡率增加到前 5 d 的 2 - 6 倍,并一直保持较大死亡速率到第 10 天。从表 4 看出,用蚡虫活体继代培养的菌种 G-p3 对沙里院褐球蚡的致死出现的最早,死亡率最高,在第 3 天死亡率为 1.80%,第 5 天为 6.66%,第 10 天为 71.30%,与其他培养基上的菌种之间差异显著,与 A-3 培养基上的菌种之间差异极显著;从单独加入沙里院褐球蚡虫尸的培养基 D-3 上培养 3 代的菌种对该蚡虫的致死率较其他几种培养基上培养的菌种对该蚡虫的致死率要高,在第 3 天死亡率为 1.48%,第 5 天为 6.48%,第 10 天为 58.89%;在 PDA 培养基上培养 3 代的菌种对该蚡虫的致死率最低,第 10 天蚡虫死亡率 50.56%。从表 5 看出,不同培养基上继代培养的菌种对日本龟蜡蚡的致死效果与沙里院褐球蚡有相同趋势,从日本龟蜡蚡活虫体上继代培养的菌种,对该蚡虫的致死最快,致死率最高,第 10 天死亡虫数达到 106 头,死亡率为 55.92%,与其他培养基的差异显著或极显著。单独加入日本龟蜡蚡虫尸的培养基上连续培养的 3 代菌种 E-3,对该蚡虫的致死率显著高于 A、B、C 培养基上的菌种,在第 10 天蚡虫死亡虫数达到 82 头,死亡率为 42.23%。而其他几种培养基上培养的菌种对日本龟蜡蚡的致死率都低于 40%。

由此看出,采用沙里院褐球蚡和日本龟蜡蚡活虫体作为基质继 3 代的蜡蚡霉或者用它们的虫尸加入培养基获得的继 3 代培养菌种,都对这两种蚡虫有比较高的致死率,其中以活虫体培养的菌种对蚡虫的致死快,致死率最高。

2.7 继代培养后菌株的蛋白酶和几丁质酶活性与对蚡虫致死率的关系

用上述不同培养基上继 3 代后菌株的蛋白酶和几丁质酶活性与它们对两种蚡虫第 10 天的致死率作直线回归,发现菌种蛋白酶活性与沙里院褐球蚡的死亡率之间的回归方程为 $Y = 0.0586x - 1.1066$,相关系数 $r = 0.9341$ 。与日本龟蜡蚡的死亡率之间的回归方程为 $Y = 0.0553x + 0.0058$,相关系数 $r = 0.9612$ 。说明菌种蛋白酶活性与对蚡虫的致死率成显著的直线正相关关系。同样用菌种的几丁质酶活性分别与沙里院褐球蚡和日本龟蜡蚡第 10 天致死率做直线回归运算,得到回归方程 $Y = 0.0277x - 0.5094$, ($r = 0.8428$) 和 $Y = 0.0265x - 0.0006$, ($r = 0.8937$),也都为显著正相关关系。

同时也可以看出,菌种蛋白酶活性与蚡虫死亡

率的相关性相对较高,说明蛋白酶活性在菌种致死蚡虫过程中发挥的作用更大,是一个最重要的毒力因子。菌种几丁质酶活性与蚡虫死亡率之间也成直线相关,说明它在菌种致死蚡虫过程中也发挥了直接作用,但是,它的作用比蛋白酶的相对较低。

3 讨论

在应用昆虫病原真菌对害虫进行生物防治中,保持菌种的正常生长和高侵染活性非常重要。一些研究已经显示,在人工条件下对菌种连续多代培养,会造成菌种退化,对靶标害虫的致病力下降^[15]。本文研究结果发现,不同基质的培养基对蚡虫病原真菌蜡蚡霉菌株 No. V3.4504 的菌落生长、胞外酶活性和致病力有显著影响。在 PDA 培养基上连续培养 9 代,由于接种传代的过程中主要是挑取了长的比较好的菌落继续进行继代培养,所以,在培养基上的菌落中(图 1)没有观察到局变的突变发生和扇形的角变区现象,但是观察到了菌落变得比较稀疏,气生菌丝徒长,孢子层较薄。菌落的生长速度达到 2.71 mm/d,比其他培养基上的都快。但它上面的产孢量却最低,只有 2.95×10^6 孢子/cm²。同时,在 PDA 培养基上连续培养菌种的胞外蛋白酶和几丁质酶的活性逐代降低(图 3-A、3-B),其中蛋白酶在第 1 代时活性是 1.99 U/g,到第 9 代降低为 1.56 U/g,降低了 22%。几丁质酶从第 1 代的 0.92 U/g 降低到第 9 代的 0.65 U/g,降低了 30%。这说明菌种在多代培养过程中,适应了 PDA 培养基,出现了退化现象,因为胞外蛋白酶和几丁质酶的活性是菌种感染昆虫的毒力指标^[16]。Hatzipapss 等研究 *Alternaria alternata* 在 PDA 上的孢子萌发状况,指出在 PDA 培养基上的菌丝生长旺盛但是产孢量却很少^[17]。Lazreg 等研究了蜡蚡轮枝菌 4 个菌株在 3 种不同培养基上(SDAY, PDA 和 CZAPECK-DOX)上的生长状况及对烟粉虱 *Bemisia tabaci* 的毒力,结果发现,菌株在 SDAY 上生长速率慢,而产孢量反而最高,毒力也最高^[18]。许志斌比较绿僵菌继代培养 1 - 18 代中菌丝体的酯酶同工酶及毒力的变化,发现随着传代的增多,酯酶同工酶有明显的差异,酶的活性在不断减弱,继代次数越多对目标害虫椰心叶甲 4 龄幼虫的毒力越差。这与本文的结果是相似的^[19]。

前人的研究发现在培养基中加入动物性蛋白或其他一些添加剂可以提高昆虫病原真菌的致病力。蔡国贵在培养基中加入松毛虫和木毒蛾的干虫尸,

发现对白僵菌不同菌株的菌落生长、产孢量及毒力显示出一定影响,最明显的是提高了产孢量^[20]。用蜡蚧轮枝菌控制菊小长管蚜 *Macrosiphoniella sanborni*,发现在控制蚜虫中菌株的产孢量起到重要的作用^[21]。研究还发现蜡蚧轮枝菌的产孢量和胞外酶活性高的菌株,对害虫致死率高^[22]。本研究在培养基中分别加入沙里院褐球蚧 D 和日本龟蜡蚧的虫尸 E,或同时加入两种蚧虫的虫尸 F,发现菌落质地均匀,致密,孢子层厚,很少出现局变。其产孢量平均值达到 $6.93 \times 10^6 - 7.35 \times 10^6$ 孢子/cm²,明显大于 PDA 培养基上 3.87×10^6 孢子/cm² 的孢子产量。并且发现,在加入虫尸的培养基上连续培养 3 代,产孢量上升最明显,达到 $8.68 \times 10^6 - 9.13 \times 10^6$ 孢子/cm²。同时,菌种的胞外蛋白酶和几丁质酶活性比在 PDA 培养基上的显著提高,菌种在 PDA 培养基上 9 代的胞外蛋白酶活性平均 1.78 U/g,而在 D、E、F 培养基上的胞外蛋白酶活性平均值分别达到 2.16、2.18、2.16 U/g。同样,在 PDA 培养基上 9 代的几丁质酶活性平均 0.79 U/g,在加入虫尸的 D、E、F 培养基上的平均值分别达到 1.01、1.03、1.01 U/g。这些都说明加入这两种蚧虫的虫尸对保持菌种的产孢量和胞外酶活性有重要作用,是人工扩大繁殖和连续培养中改善培养基成分的一个依据。我们的试验结果还显示,培养基加入蛋白胨对改善菌种活力不如加入蚧虫尸体的效果好。据本实验室朱文雅等和彭国良的研究,沙里院褐球蚧体壁的蛋白质占总成分的 84.0%,几丁质占 4%。日本龟蜡蚧体壁的蛋白质占总成分 72.0%,几丁质占 4%。在日本龟蜡蚧全虫体组织中除了蛋白质(33.57%)以外,还包含 18 种氨基酸^[23-24],说明蚧虫的虫体对蜡蚧霉来说是一个多组分的复合营养,可以防止菌种退化,有利于保持菌种的活力和对蚧虫的毒力。本试验还采用沙里院褐球蚧和日本龟蜡蚧的活虫体作为基质培养蜡蚧霉,连续培养 3 代,其蛋白酶活性分别达到 3.08 U/g 和 2.92 U/g,几丁质酶的活性是 1.45 U/g 和 1.42 U/g,这不仅比 PDA 培养基上的高出 40% 左右,而且比在培养基中加入蚧虫尸体的酶活还要高。这说明在连续多代培养蜡蚧霉后,采用活蚧虫进行菌种复壮是很有意义的。Sun 等就是利用 *Metarhizium anisopliae* 和 *Beauveria bassiana* 在白蚁 *Coptotermes formosanus* 活体上萌发,利用白蚁的群居效应,通过用染病的活虫体继续感染健康的虫体,认为这样有利于保持菌种的高毒力,提高致病力^[25]。Yang 等也是利用 *Pissodes punctatus*

活虫体对虫草棒束孢 *Isaria farinosa* 进行复壮来提高菌种的毒力。这些研究结果与我们的结果是相似的^[26]。

从我们试验的几种培养基 3 代后,菌株的蛋白酶和几丁质酶活性与它们对两种蚧虫致死率之间的直线相关性看出,这两种胞外酶确实在致死蚧虫过程中发挥了很大的作用,是该菌种的毒力因子。其中蛋白酶活性与蚧虫死亡率的直线相关系数达到 0.93 - 0.96,比几丁质酶的 0.84 - 0.89 高,说明蛋白酶的作用似乎更大。这与蚧虫表皮中蛋白质的含量远比几丁质多的事实是吻合的^[24]。这也支持了冯明光等曾主张将胞外蛋白酶活性作为筛选球孢白僵菌毒力指标的观点^[27]。

本次研究还发现,采用沙里院褐球蚧活虫体做基质或者在培养基中加入它的虫尸,培养 3 代后的菌种,对沙里院褐球蚧的致死率要高于从日本龟蜡蚧虫体上或者加入日本龟蜡蚧虫尸的培养基上获得的菌种,同样,用对日本龟蜡蚧活虫体或加入该虫的虫尸培养的菌种,对日本龟蜡蚧的致死率要高于对沙里院褐球蚧的致死率。这说明在实际中根据防治蚧虫的种类不同,采用相应的靶标昆虫作为病原菌种复壮和致病力的诱导材料,使菌种更好的适应靶标寄主,对提高防治效果是有意义的。

此外,继代培养的蜡蚧霉菌株 No. V3.4504 对沙里院褐球蚧的致死率略大于日本龟蜡蚧,这很可能与沙里院褐球蚧背部只有一层薄薄的蜡壳,而日本龟蜡蚧背部蜡壳很厚^[28]有关。Safavi 等曾在研究白僵菌的毒力与培养基中氮源的关系提出,病原真菌的毒力大小与侵染的寄主相关性很大,它受寄主表皮、生理结构、环境等多方面因素的影响。根据昆虫的表皮结构,虫生真菌入侵寄主的第一道屏障是昆虫表皮的蜡脂,脂肪酶在这一步起到重要的作用^[29]。根据蚧虫蜡分泌物的主要成分是脂肪醇、脂肪酸、酯类等长碳链化合物的特点^[28],蜡蚧霉在感染蚧虫过程中除了蛋白酶和几丁质酶以外,脂肪酶可能也发挥一定的作用,这方面还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Ben-Dov Y, Miller D, Gibson G. *Scalenet*: <http://www.sel.barc.usda.gov/scalenet/scalenet.htm>. 2009.
- [2] Sung GH, Sung JM, Hywel-Jones NL. A multi-gene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2007, 44:1204-1223.

- [3] Evans HC, Hywel-Jones NL. Entomopathogenic fungi. In: Ben-Dow Y, Hodgson CJ (Eds), *Soft Scale Insects: Their Biology, Natural Enemies and Control*, Elsevier, Amsterdam & New York, 1997, 7B:15-16.
- [4] Evans HC, Prior C. Entomopathogenic fungi. In: Rosen D (Eds.), *Armored Scale Insects: Their Biology, Natural Enemies and Control*. Elsevier, Amsterdam & New York, 1990, 4B:8-15.
- [5] Liu WM, Xie YP, Xue JL, et al. Histopathological changes of *Ceroplastes Japonicus* infected by *Lecanicillium Lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2009, 101(2): 96-105.
- [6] 彭国良, 薛皎亮, 刘卫敏, 等. 蜡蚧轮枝菌入侵蚧虫表皮过程中蛋白酶和几丁质酶的作用 应用环境与生物学报 (*Chinese Journal Applied Environmental Biology*), 2009, 15(2): 220-225.
- [7] 蒲蛰龙, 李增智. 昆虫真菌学. 合肥: 安徽科学技术出版社. 1996: 76-111.
- [8] 金洁, 张作法, 时连根. 昆虫病原白僵菌的分子生物学研究进展. 科技通报 (*Bulletin of Science and Technology*), 2007, 23(6): 842-846.
- [9] 王刚, 董建臻, 曹伟平等. 球孢白僵菌胞外蛋白酶及几丁质酶的研究进展. 中国农学通报 (*Chinese Agricultural Science Bulletin*), 2009, 25(13): 175-178.
- [10] Steenberg T, Humber RA. Entomopathogenic potential of *Verticillium* and *Acremonium* species (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Journal of Invertebrate Pathology*, 1999, 73: 309-314.
- [11] Matsumoto Y, Gerardo SC, Sergio R, et al. Production of β -N-acetylhexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid state and submerged fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer. *Process Biochemistry*. 2004, 39: 665-671.
- [12] 彭国雄, 张亚军, 张永军等. 球孢白僵菌不同世代菌株胞外蛋白酶与毒力的关系. 中国生物防治 (*Chinese Journal of Biological Control*), 2000, 16(2): 61-64.
- [13] 李会平, 黄大庄, 王志刚等. 不同基质传代白僵菌菌株胞外蛋白酶和几丁质酶产生水平与菌株对桑天牛幼虫毒力的关系. 蚕业科学 (*Acta Sericologica Sinica*), 2008, 34(3): 521-524.
- [14] 曹广春. 小菜蛾 *plutella xylostella* (L.) 对虫酰肼的抗性及其机理研究. 南京农业大学博士论文, 2007: 435-112.
- [15] Schaerffenberg B. Biological and environmental conditions for the development of mycoses caused by *Beauveria* and *Metarhizium*. *Journal of Insect Pathology*, 1964, 6: 8-12.
- [16] Campos RA, Arruda W, Boldo JT, et al. *Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorphia* and *Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. *Current Microbiology*, 2005, 50: 257-261.
- [17] Hazipapas P, Kalosaka K, Dara A, et al. Spore germination and appressorium formation in the entomopathogenic *Alternaria alternata*. *Mycological Research*. 2002, 106(11): 1349-1359.
- [18] Lazreg F, Shaikat A, Ren SX, et al. Biological characteristics and pathogenicity of *Verticillium lecanii* against *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on eggplant. *Pakistan Entomologist Journal*, 2007, 29(2): 63-72.
- [19] 许志斌. 绿僵菌传代菌株的退化. 南昌大学硕士论文, 2007: 23-44.
- [20] 蔡国贵, 林庆源, 徐耀昌等. 白僵菌菌株退化与培养条件关系及其控制技术. 福建林学院学报 (*Journal of Fujian College of Forestry*), 2001, 21(1): 76-79.
- [21] Jackson CW, Heale JB, Hall RA. Traits associated with virulence to the aphid *Macrosiphoniella sanborni* in eighteen isolates of *Verticillium lecanii*. *Annals of Applied Biology*, 1985, 106: 39-48.
- [22] Lee, MH, Yoon CS, Yun TY, et al. Selection of a highly virulent *Verticillium lecanii* strain against trialeurodes vaporariorum at various temperatures. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2002, 12: 145-148.
- [23] 朱文雅, 谢映平, 薛皎亮. 六种蚧虫虫体化学成分的分析. 山西大学学报 (自然科学版) (*Journal of Shnaxi University Natural Science Edition*), 2007, 30(50): 123-125.
- [24] 蜡蚧轮枝菌入侵蚧虫过程中胞外酶作用及提高酶活性的研究. 山西大学硕士论文, 2009: 18-20.
- [25] Sun JZ, James RF, Henderson G. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Coptotermes formosanus* and in vitro. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2002, 81: 78-85.
- [26] Yang S, Zhuang H, Li YH. Insecticidal efficacy of *Isaria farinosa* in different life stages of *Pissodes punctatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Pesticide Science*, 2009; DOI 10.1007/s10340-009-0256-y.
- [27] 冯明光. 胞外蛋白酶和脂酶活性作为球孢白僵菌毒力指标的可靠性分析. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 1998, 38(6): 461-467.
- [28] 谢映平, 薛皎亮, 郑乐怡. 蚧科昆虫的蜡分泌物超微结构和化学成分. 北京: 中国林业出版社, 2006: 15-32.
- [29] Safavi SA, Shah FA, Aziz K, et al. Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Fems Microbiology Letters*, 2007, 270: 116-123.

Effect of multi-generation culture on virulence of *Lecanicillium lecanii* in different media

Zhenzhen Han, Yingping Xie, Jiaoliang Xue*, Jinhua Fan

(College of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: [**Objective**] The strain No. V3.4504 of *Lecanicillium lecanii* (Zimmermann), an entomopathogenic fungus, was studied on the effect of successive multi-generation culture in seven different media on its colony growth characteristics, extracellular enzyme activities and the virulence against scale insects. [**Methods**] The strain No. V3.4504 of *L. lecanii* was original isolated from a natural infected scale insect. The two species of scale insects used were *Rhodococcus sariوني* Borchsenius and *Ceroplastes japonicus* Green. Seven media were used and fungus colony characteristics, growth rate and sporulation, extracellular protease and chitinase activity, and infective effect against the two species of scale insects were conducted. [**Results**] The fungus cultured on PDA medium for successive nine generations showed the most fast in colony growth, the minimal in sporulation, straight decline of extracellular protease and chitinase activity with generation increasing, and the minimal mortality of the scale insects. There was no significant effect to promote virulence of the fungus by increasing peptone into medium. On the media D, E and F, that with the body materials of the two scale insects, although the fungus appeared lower in the colony growth rate, its sporulation was higher upward $8.83 \times 10^6 - 9.13 \times 10^6$ spores/cm², extracellular protease and chitinase activities averagely reached 2.16 - 2.13 U/g and 1.01 - 1.03 U/g respectively, and the mortalities of the two scale insects were 55% - 58% and 39% - 42% respectively. Cultured three generations in vitro of the two scale insects, the fungus exhibited the highest activities in its protease and chitinase that were 3.08 - 2.92 U/g and 1.45 - 1.42 U/g respectively and the best infection effect against the two scale insects with mortalities of 71.30% and 58.89% respectively. A linear correlation was found between extracellular protease and chitinase activities of the fungus and the mortalities of the scale insects. [**Conclusion**] Cultured on PDA medium successive multiple generations made retrogradation of the strain No. V3.4504 of *L. lecanii*. It was significant effect on keeping the vigor and higher virulence of the fungus adding the body materials of the scale insects into the medium. The vitro by using live scale insects as medium materials was the best way for the rejuvenation of the entomopathogenic fungus and promoting its virulence.

Keywords: Entomopathogenic fungus; *Lecanicillium lecanii*; scale insect; extracellular protease; chitinase

(本文责编:张晓丽)