

蜡蚧轮枝菌的碳·氮营养源研究

刘春来^{1,2}, 王爽², 李新民², 刘兴龙², 夏吉星², 杨帆², 马玲^{1*}

(1. 东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040; 2. 黑龙江省农业科学院植物保护研究所, 黑龙江哈尔滨 150086)

摘要 [目的] 筛选影响蜡蚧轮枝菌生长的营养因子, 为该菌的开发生产提供科学依据。[方法] 以固体基础培养基 1 L 水中 20 g 葡萄糖的含碳量(8.00 g/L)、2 g 蛋白胨的含氮量(0.29 g/L)及少量无机盐为标准, 用蔗糖等碳源及酵母膏等氮源分别取代基础培养基中的葡萄糖和蛋白胨。研究了固体培养基中不同碳、氮源对 6 株蜡蚧轮枝菌菌株菌丝生长和产孢的影响。[结果] 葡萄糖有利于 V₂、V₄、V₅ 和 V₆ 菌株的菌丝生长和产孢; 可溶性淀粉为碳源时, V₁ 和 V₃ 菌株的生物量和产孢量均很高; 有机氮源酵母膏可大大提高各菌株的生物量及产孢量。[结论] 葡萄糖与酵母膏组合是适合于多数供试蜡蚧轮枝菌菌株菌丝生长和产孢的碳氮源。

关键词 蜡蚧轮枝菌; 碳源; 氮源; 生物量; 产孢量

中图分类号 S482 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)32-12595-02

Research on Carbon and Nitrogen Sources of *Verticillium lecanii* Cultured on Solid Matrix

LIU Chun-lai et al (Plant Protection Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract [Objective] The study aimed to select nutritional factors of effecting growth on *Verticillium lecanii*. [Method] Based on a defined basal medium composed of 20g glucose (equivalent to 8.0 g/L carbon), 2 g peptone (equivalent to 0.29 g/L nitrogen), and small amount of inorganic salt in 1 liter of water, the six *Verticillium lecanii* strains were cultured on solid agar media which glucose or peptone in basal medium were substituted by various carbon sources (sucrose etc) or nitrogen sources (yeast extract etc) at the same C or N concentrations of basal medium respectively. The effect of carbon or nitrogen sources on mycelial growth and sporulation of strains was evaluated via measurement of colony growth and spore yield. [Result] The results showed that glucose was more suitable for the mycelial growth and sporulation of V₄、V₅、V₆ strains. Strains of V₁ and V₃ produced a high biomass and high concentrations of spores with soluble amylum; the biomass and the sporulation quantity of all six strains could be produced in large quantity with yeast extract of organic nitrogen source. [Conclusion] The combination of glucose and yeast extract was suitable for mycelial growth and sporulation of the six *V. lecanii* strains.

Key words *Verticillium lecanii*; Carbon source; Nitrogen source; Biomass; Sporulation

蜡蚧轮枝菌 [*Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas] 是一种重要的昆虫病原真菌, 1861 年由 Neither 首次发现该菌^[1]。其寄主范围广, 主要寄生蚜虫、粉虱、蚧类^[2] 及一些植物病原菌^[1,3], 如锈病菌、黄瓜白粉病菌等^[4-5]。因其寄主范围及地理分布广、不污染环境、对人畜和天敌安全、不易产生抗药性^[6], 可与某些杀虫、杀螨剂同时混用、易培养等优点, 已成为一种极具开发潜能的生防真菌^[7]。生防真菌的生物量或繁殖体的生产对于真菌生物农药生产至关重要, 营养条件对生防真菌的生长、繁殖及其毒力具有决定性作用^[8-10]。我国对蜡蚧轮枝菌的研究起步较晚, 有关营养因素对其生长的影响方面研究较少。孟艳琼利用不同碳、氮源液体发酵培养蜡蚧轮枝菌, 发现白砂糖和酵母浸粉及黄豆粉可促进菌丝生长, 并可提高生物量^[11]。李锋等报道了酵母浸粉的添加可提高蜡蚧轮枝菌的产孢量^[12]。笔者利用平皿固体培养方法, 研究了不同碳源、氮源对 6 株蜡蚧轮枝菌生物量及产孢量的影响, 旨在为蜡蚧轮枝菌的开发生产提供科学依据。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源。 6 株蜡蚧轮枝菌 (V₁、V₂、V₃、V₄、V₅、V₆) 由俄罗斯全俄植物保护研究所提供。

1.1.2 培养基。

1.1.2.1 基础培养基。 葡萄糖: 20.00 g, 蛋白胨: 2.00 g,

K₂HPO₄: 1.00 g, KCl: 0.50 g, MgSO₄: 0.50 g, FeSO₄: 0.01 g, 琼脂: 20.00 g, 水: 1 000 ml, pH: 7。

1.1.2.2 碳源培养基。 以基础培养基中葡萄糖 20.00 g/L 的含碳量(8 g/L)为标准, 分别用蔗糖、麦芽糖和可溶性淀粉等碳源取代基础培养基中的葡萄糖, 使各种培养基碳元素的含量为 8 g/L, 以基础培养基作为对照。

1.1.2.3 氮源培养基。 以基础培养基中蛋白胨 2.00 g/L 的含氮量(0.29 g/L)为标准, 分别用酵母膏、玉米浆、NaNO₃ 和 (NH₄)₂SO₄ 等氮源取代基础培养基中的蛋白胨, 使各种培养基氮元素的含量为 0.29 g/L, 以基础培养基作为对照。

1.2 方法

1.2.1 接种菌液制备。 将保存于斜面的菌株活化, 并接种于 PDA 液体培养基中, 于 25 °C、转速 160 r/min 摇床培养 96 h 后, 用血球计数板测定芽生孢子产量, 用无菌水调整菌液浓度为 10⁷ 个/ml 备用。

1.2.2 菌株接种及培养。 将已灭菌的滤纸 (D = 70 mm) (Whatman International Ltd Maidstone England) 覆盖于培养基中央, 室温放置 3 d, 剔除杂菌污染的平板, 用移液器取 10 μl 菌液接种于滤纸中央, 于 25 °C 培养箱中恒温培养 14 d。

1.2.3 菌株生物量和产孢量测定。 培养结束后, 将生长于滤纸表面的菌落称重, 获得生物量后; 用无菌刮铲将菌落移至装有 10 ml 无菌水 (含浓度为 0.05% 吐温 80) 的试管中, 振荡 1 min, 再在超声波清洗器中震动 15 ~ 20 s, 使孢子充分分散, 血球计数板测定孢子产量。每处理 3 次重复。

1.2.4 数据统计。 采用 Excel 2003 软件进行数据处理、分析; 利用 SAS 软件中邓肯新复极差法进行差异显著性分析。

基金项目 国家国际科技合作专项项目 (2012DFR30810)。

作者简介 刘春来 (1975 -), 男, 山东平度人, 副研究员, 博士, 从事微生物农药方面研究。* 通讯作者, 教授, 博士生导师, 从事森林有害生物治理和湿地生态学研究。

收稿日期 2013-10-13

2 结果与分析

2.1 以蛋白胨为氮源不同碳源对蜡蚧轮枝菌生物量及产孢量的影响 由表1可知,不同菌株生长所需的最佳碳源有所不同。以可溶性淀粉为碳源,菌株V₁、V₃的生物量及产孢量均较高,其中V₁菌株的生物量和V₃菌株的产孢量均显著高

于其他碳源;麦芽糖最适合V₂和V₅菌株的菌丝生长及产孢,V₅菌丝生产量及产孢量与其他碳源差异不显著。以葡萄糖为碳源,菌株V₂、V₄、V₅、V₆的生物量及菌株V₁、V₂、V₄、V₅、V₆的产孢量均相对较高。因此,对多数供试菌株来说,葡萄糖是较为适合的一种碳源。

表1 不同碳源蜡蚧轮枝菌生物量与产孢量比较

碳源	V ₁		V ₂		V ₃		V ₄		V ₅		V ₆	
	生物量	产孢量	生物量	产孢量	生物量	产孢量	生物量	产孢量	生物量	产孢量	生物量	产孢量
	mg	×10 ⁷ 个	mg	×10 ⁷ 个	mg	×10 ⁷ 个	mg	×10 ⁷ 个	mg	×10 ⁷ 个	mg	×10 ⁷ 个
可溶性淀粉	889.08 a	36.0 a	440.64 b	5.8 b	609.04 a	76.5 a	354.61 a	93.1 c	494.74 a	79.6 a	370.18 a	130.4 a
麦芽糖	732.11 b	24.6 a	595.94 a	15.9 a	519.14 ab	45.0 b	354.11 a	190.8 a	566.91 a	122.9 a	416.54 a	211.0 a
葡萄糖	623.78 b	33.8 a	578.48 ab	11.5 a	400.34 b	36.3 b	413.28 a	175.6 ab	441.01 a	119.8 a	420.31 a	294.8 a
蔗糖	724.91 b	38.1 a	519.28 ab	15.9 a	516.71 ab	36.7 b	350.18 a	126.9 bc	507.71 a	105.8 a	453.21 a	198.1 a

注:同列不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

2.2 以葡萄糖为碳源不同氮源对蜡蚧轮枝菌生物量及产孢量的影响 由表2可知,几种供试氮源中,酵母膏最适合V₂、V₃、V₄、V₅及V₆菌株菌丝的生长。以酵母膏为氮源时,V₂菌株的生物量为所有处理中最高,达739.24 mg;适合V₁菌株生长的氮源为硝酸钠,生物量为689.1 mg,但与酵母膏差异不显著。从产孢量来看,酵母膏有利于V₁、V₃、V₄、V₅及V₆

菌株的产孢;其中V₆菌株的产孢量最高,达483.3 × 10⁷个/菌落。硫酸铵能显著促进V₂菌株的产孢,产孢量为45.8 × 10⁷个/菌落。可见,6株蜡蚧轮枝菌菌株在氮源的需求上表现出较好的一致性,即以酵母膏为氮源时均有利于菌株菌丝生长和产孢。

表2 不同氮源蜡蚧轮枝菌生物量与产孢量比较

氮源	V ₁		V ₂		V ₃		V ₄		V ₅		V ₆	
	生物量	产孢量	生物量	产孢量	生物量	产孢量	生物量	产孢量	生物量	产孢量	生物量	产孢量
	mg	×10 ⁷ 个	mg	×10 ⁷ 个	mg	×10 ⁷ 个	mg	×10 ⁷ 个	mg	×10 ⁷ 个	mg	×10 ⁷ 个
蛋白胨	623.8 a	33.8 b	578.5 ab	11.5 b	400.3 bc	36.3 a	413.3 b	175.6 b	441.0 bc	119.8 a	420.3 b	294.8 bc
酵母膏	445.0 a	81.0 a	739.2 a	9.3 b	719.9 a	62.3 a	531.5 a	402.7 a	664.8 a	94.2 a	594.1 a	483.3 a
硫酸铵	535.9 a	17.5 b	682.2 ab	45.8 a	547.2 b	63.5 a	289.3 d	182.3 b	418.8 c	140.2 a	465.7 ab	166.5 c
硝酸钠	689.1 a	50.4 ab	465.0 b	6.5 b	371.6 c	66.0 a	363.4 bc	137.7 b	558.4 ab	113.3 a	475.1 ab	366.7 ab
玉米浆	576.8 a	30.8 b	547.7 ab	12.2 b	440.8 bc	43.1 a	323.0 cd	229.6 b	345.5 c	46.5 b	454.0 ab	287.7 bc

注:同列不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

2.3 适合蜡蚧轮枝菌生长和孢子形成的最适碳氮源 由表3可知,不同菌株都有其适于菌丝生长和孢子形成的最佳碳氮源组合。除最适合V₁菌株菌丝生长及V₃菌株产孢的培养基为可溶性淀粉和蛋白胨组合外,葡萄糖与酵母膏组合是适合于多数供试蜡蚧轮枝菌菌株菌丝生长和产孢的碳氮源。

表3 蜡蚧轮枝菌生长和孢子形成的最适碳氮营养源

菌株	菌丝生长		孢子形成	
	碳氮源	生物量 mg	碳氮源	孢子产量 个
V ₁	淀粉、蛋白胨	889.08	葡萄糖、酵母膏	8.10 × 10 ⁸
V ₂	葡萄糖、酵母膏	739.24	葡萄糖、硫酸铵	4.58 × 10 ⁸
V ₃	葡萄糖、酵母膏	719.88	淀粉、蛋白胨	7.65 × 10 ⁸
V ₄	葡萄糖、酵母膏	531.51	葡萄糖、酵母膏	4.03 × 10 ⁹
V ₅	葡萄糖、酵母膏	664.84	葡萄糖、硫酸铵	1.40 × 10 ⁹
V ₆	葡萄糖、酵母膏	594.14	葡萄糖、酵母膏	4.83 × 10 ⁹

3 讨论

通过研究初步明确不同菌株间的菌丝生长和产孢对碳氮源的利用具有相对的选择性。如葡萄糖是V₂、V₄、V₅、V₆菌株可利用碳源,菌株的生物量及产孢量均较高,原因可能是这几个菌株对单糖的利用效果优于对多糖;而多糖麦芽糖

最有利于V₂、V₅菌株的菌丝生长及产孢,但与葡萄糖相比差异不显著;适合V₁和V₃的碳源则为可溶性淀粉。在氮源的利用上,有机氮源是6株蜡蚧轮枝菌较好的氮源,无机氮源相对效果较差。对大多数菌株而言,以酵母膏作为氮源时,菌株在菌丝生长和产孢上均表现出较好的利用效果(该结果与孟艳琼^[8]和李锋^[9]的报道相一致),表现出较高的一致性,只有硫酸铵适合V₂和V₅菌株的产孢。笔者将菌株培养后的生物量和产孢量相结合进行分析,初步确定了葡萄糖与酵母膏组合是有利于实验菌株蜡蚧轮枝菌生长的碳、氮源,为今后菌株的进一步发酵生产和利用提供了有意义的参考。试验是在固定碳源(葡萄糖)对所选的氮源进行分析,至于固定氮源(蛋白胨)对所选碳源进行对比的基础上得出的结果,如换作其他碳源或氮源是否有更好的碳、氮源组合则有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 周燧,王中康,喻子牛. 微生物农药研发与应用[M]. 北京:化学工业出版社,农业科技出版中心,2006:105.
- [2] ROMBACH M C, GILLESPIE A T. Entomogenous Hyphomycetes for insect and mite control on greenhouse crops [J]. Biocontrol News and Information, 1988, 9:7-18.

(下转第12599页)

2.2 蔬菜餐前处理对农残的影响

2.2.1 流水冲洗时间对农药残留的影响。从图 1 可以看出,流水冲洗可显著降低蔬菜农药残留量,冲洗时间越长,农药残留量越低,去除蔬菜农残,自来水冲洗以 10 min 左右为宜。

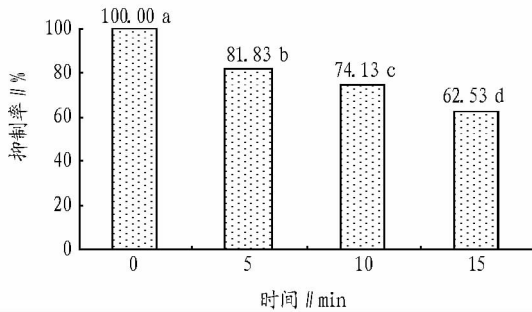


图 1 流水冲洗时间对蔬菜农药残留的影响

2.2.2 清水浸泡时间对农药残留的影响。由于大多数农药是水溶性的,因此,浸泡蔬菜可使农药溶于水,从而降低残留量。从图 2 可以看出,随着浸泡时间的延长,农药残留量不断降低,30 min 时,农药残留降低了 30.67 个百分点,但是超过 30 min,农残反而增加,因此,浸泡以 30 min 为宜。浸泡法主要适用于叶类菜和花类菜。

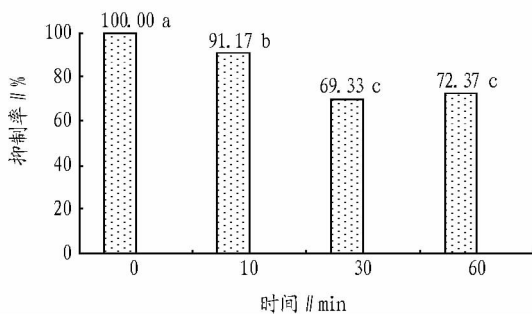


图 2 清水浸泡时间对蔬菜农药残留的影响

2.2.3 漂烫时间对农药残留的影响。从图 3 可以看出,沸水漂烫去除蔬菜农药残留的效果显著,漂烫初期,蔬菜农药残留下降速度较快。0~0.5 min 时,农药残留抑制率下降了 17.93 个百分点,随漂烫的时间延长,农药的残留量逐渐降低,漂烫 2.0 min,农药残留可降低 45.33 个百分点,但与漂烫

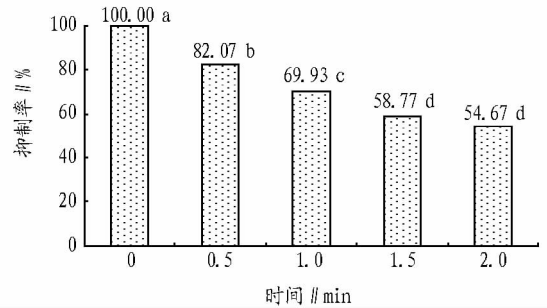


图 3 漂烫时间对蔬菜农药残留的影响

1.5 min 无显著差异。由于漂烫能使蔬菜损失营养,因此,沸水漂烫以 1 min 左右为宜。

3 结论

(1) 深圳南山区蔬菜的农残安全状况总体较好,各街道市售蔬菜的蔬菜农残合格率达 99.48%,瓜果类和花菜类蔬菜农药残留量全部合格,叶菜类和豆菜类蔬菜的农残状况相对较差。不同类型市场的蔬菜农药残留状况差异较大,以超市和农贸市场的安全状况最好,批发市场次之,地摊菜的农残超标率较高,超标率达 22.92%。蔬菜食用前经过冲洗、浸泡和漂烫处理均能显著降低蔬菜农药残留量,以冲洗 10 min、浸泡 30 min、漂烫 1 min 左右为宜,也可 3 种方式相结合,以最大限度地降低蔬菜农药残留。

(2) 针对地摊蔬菜的安全问题,可采取以下措施保证市民的食用安全:①做好超标蔬菜的监督销毁工作;②对辖区内的菜农加强蔬菜用药间隔期的教育;③加强与辖区城管部门的沟通,加大对蔬菜乱摆乱卖的清理和整治力度。

参考文献

- [1] 董晓梅,何志佳,麦承罡,等. 广州市部分居民对食品安全的认知、态度调查[J]. 现代预防医学,2007,34(3):578-579,584.
- [2] 李梅,周颖,何广祥. 佛山城乡居民食品安全意识的差异性分析[J]. 中国卫生事业管理,2011(7):544-547.
- [3] 王瑞,黄昭瑜,古松浩,等. 深圳市 2006 年市售蔬菜农药残留情况分析[J]. 安徽农业科学,2007,35(31):9961-9962.
- [4] 吴淳,黄敏通,王瑞,等. 深圳市场蔬菜农药残留例行监测结果与分析[J]. 现代农业科技,2009(21):135-136.
- [5] 王瑞,古松浩,张兵,等. 深圳市蔬菜农药残留分析[J]. 检验检疫学刊,2009(2):51-54.
- [6] 林敏霞,王瑞,唐昌景,等. 深圳市场蔬菜农药残留监测研究——以 2009 年为例[J]. 广东农业科学,2011(6):177-178,182.
- [7] WHIPPS J M. A review of white rust (*Puccinia horiana* Henn.) disease on chrysanthemum and the potential for its biological control with *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas[J]. Ann Appl Biol, 1993, 122:173-187.
- [8] 陈吉棣. 蜡蚧轮枝孢及其在生防中的应用[J]. 生物防治通报,1985,1(4):32-37.
- [9] JEONG JUN KIM, GOETTEL M S, GILLESPIE D R. Potential of Lecanicillium species for dual microbial control of aphids and the cucumber powdery mildew fungus, *Sphaerotheca fuliginea*[J]. Biological Control, 2007, 40:327-332.
- [10] 李国霞,郭友中,茅洪新,等. 应用蜡蚧轮枝菌对大棚蔬菜蚜虫防治效果的研究[J]. 中国病毒学,2000(15):262.
- [11] MILNER R J. Prospects for biopesticides for aphid control [J]. Entomophaga, 1997, 42:227-239.
- [12] 高利. 液体与固体培养几种生防真菌的营养研究[J]. 中国生物防治, 2009, 25(4):322-327.
- [13] GAO L, SUN M H, LIU X Z, et al. Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi[J]. Mycological Research 2007, 111(1):87-92.
- [14] UZMA MUSTAFA, GURVINDER KAUR. Effects of carbon and nitrogen sources and ratio on the germination, growth and sporulation characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates[J]. African Journal of Agricultural Research, 2009, 3(10):922-930.
- [15] 孟艳琼. 蜡蚧轮枝孢的生物学特性及防治温室桃蚜的研究[D]. 合肥:安徽农业大学,2003.
- [16] 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.

(上接第 12596 页)