

生防真菌爪哇虫草 IF-1106 液生分生孢子、芽生孢子与气生分生孢子的表面特征及耐逆性

高美瑜, 李俊梅, 李义华, 相会明, 马瑞燕, 周稳稳*

山西农业大学植物保护学院, 山西 太谷 030801

摘要: 爪哇虫草是一种具有生防潜力的昆虫病原真菌, 可以防治同翅目、半翅目、鳞翅目、缨翅目、鞘翅目等多种重要害虫。对其进行液体发酵培养可获得液生分生孢子和芽生孢子, 固体培养可得到气生分生孢子。本文对比了爪哇虫草 IF-1106 的 3 种孢子在形态、粒径及表面超微结构等方面的差异。结果表明, 气生分生孢子、液生分生孢子和芽生孢子形态各异, 平均粒径分别为 4.45、4.17 和 7.67 μm ; 通过扫描电镜(SEM)观察到 3 种孢子一端均具有类似产痕的结构, 但气生分生孢子表面粗糙, 似小棒层覆盖。芽生孢子表面光滑, 有明显龟裂, 有些孢子有分节现象。液生分生孢子表面光滑, 有少量细小裂纹, 有些孢子具有类似芽痕的结构; 透射电镜(TEM)显示了 3 种孢子细胞壁厚度和外层结构具有明显差异; 碳氢吸附能力(MATH)试验表明, 3 种孢子的疏水性顺序为气生分生孢子>芽生孢子>液生分生孢子; 此外, 测定了 pH 在 3.0–9.0 时孢子表面 Zeta 电位变化, 气生分生孢子的 Zeta 电位从 +2.68 mV 变到 -18.44 mV, 芽生孢子电位值变化为 +5.16 mV 到 -5.51 mV, 液生分生孢子从 +0.39 mV 到 -18.09 mV, 3 种孢子等电点均在酸性范围内, 在中性条件下均带负电荷; 进一步对比了 3 种孢子的萌发速度及耐逆性, 发现芽生孢子萌发最快, 但耐逆性最差, 气生分生孢子耐逆性强, 但萌发最慢, 液生分生孢子萌发速率接近于芽生孢子, 且耐逆性最好, 展现出良好的开发潜力。综上所述, 这些结果为爪哇虫草菌在生产中的应用提供了理论基础。

关键词: 爪哇虫草; 气生分生孢子; 液生分生孢子; 芽生孢子; 表面特征; 耐逆性

[引用本文]

高美瑜, 李俊梅, 李义华, 相会明, 马瑞燕, 周稳稳, 2025. 生防真菌爪哇虫草 IF-1106 液生分生孢子、芽生孢子与气生分生孢子的表面特征及耐逆性. 菌物学报, 44(4): 240288

Gao MY, Li JM, Li YH, Xiang HM, Ma RY, Zhou WW, 2025. Surface characteristics and stress tolerance of submerged conidia, blastospores and aerial conidia of biocontrol fungus *Cordyceps javanica* IF-1106. Mycosystema, 44(4): 240288

资助项目: 山西省重点研发计划(202302140601011); 山西省科技创新人才团队专项计划(202304051001006); 晋中国家农高区植物保护教授、博士工作站科研项目(JZNGQBSGZZ001)

This work was supported by the Key Research and Development Program of Shanxi Province (202302140601011), the Special Fund for Science and Technology Innovation Teams of Shanxi Province (202304051001006), and the Scientific Research Project of Professorial and Doctoral Workstation in Plant Protection, Jinzhong National Agricultural High Development Zone (JZNGQBSGZZ001).

*Corresponding author. E-mail: wenwenzhoumail@163.com

Received: 2024-10-24; Accepted: 2024-11-25

Surface characteristics and stress tolerance of submerged conidia, blastospores and aerial conidia of biocontrol fungus *Cordyceps javanica* IF-1106

GAO Meiyu, LI Junmei, LI Yihua, XIANG Huiming, MA Ruiyan, ZHOU Wenwen*

College of Plant Protection, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China

Abstract: *Cordyceps javanica* is an entomopathogenic fungus with biocontrol potential in control of many important pests belonging to Homoptera, Hemiptera, Lepidoptera, Thysanoptera and Coleoptera. Submerged conidia and blastospores can be obtained by liquid fermentation of *C. javanica*, and aerial conidia can be obtained by solid culture. The differences in morphology, size and surface ultrastructure of the three kinds of spores of *C. javanica* IF-1106 were compared. It is clear that aerial conidia, submerged conidia and blastospores have different morphology, and the average sizes are 4.45, 4.17 and 7.67 μm , respectively. A similar structure, the scar at one end of three kinds of spores, was observed by scanning electron microscope. The surface of the aerial conidia was rough and appeared to be covered with a layer of small rods. The surface of blastospores is smooth with obvious cracks, and sometimes segmented. The surface of the submerged conidia is smooth with a few thin cracks, and some of them have structures like bud scars. Image of transmission electron microscopy showed that the cell wall thickness and outer layer structure of the three kinds of spores were significantly different. The hydrophobicity of three kinds of spores of *C. javanica* IF-1106 was determined by the test of microbial adhesion to hydrocarbons (MATH) and the results showed the hydrophobicity ranked as aerial conidia > blastospore > submerged conidia. When pH ranging from 3.0 to 9.0, the Zeta potential of aerial conidia varied from +2.68 mV to -18.44 mV, that of blastospores ranged from +5.16 mV to -5.51 mV, and that of submerged conidia changed from +0.39 mV to -18.09 mV. The isoelectric points of the three kinds of spores were in acidic range and all spores were negatively charged in neutral condition. The germination rate and stress tolerance of the three kinds of spores were compared. It was found that blastospores germinated fastest but were least stress-tolerant; the aerial conidia were more stress-tolerant but slowest germinated, while germination rate of submerged conidia was close to that of blastospores and the stress-tolerance was the best, showing good potential for utilization and development. These results provide a theoretical basis for the application of *C. javanica* IF-1106 in production.

Keywords: *Cordyceps javanica*; aerial conidia; submerged conidia; blastospore; surface characteristics; stress tolerance

爪哇虫草 *Cordyceps javanica* (Bally) Kepler *et al.*, 原名为爪哇棒束孢 *Isaria javanica*, 隶属于子囊菌门 Ascomycota、粪壳菌纲 Sordariomycetes、肉座菌目 Hypocreales、虫草菌科 Cordycipitaceae, 是一种重要的昆虫病原真菌 (Kepler *et al.* 2017), 能防治同翅目、半翅目、鳞翅目、缨翅

目、鞘翅目等多种重要害虫 (王迪 2023)。生防真菌对害虫的侵染方式是孢子先通过主动弹射或者依靠气流、水流等运动被动附着在寄主体壁, 萌发长出芽管, 进而形成侵染机构, 穿透寄主体壁进入寄主血腔, 消耗血腔内的营养导致寄主死亡 (Vega *et al.* 1999)。

生防真菌在固体培养基上萌发,继而营养菌丝生长,菌丝上分化出瓶状的分生孢子梗,有单细胞繁殖体着生其上称为气生分生孢子(aerial conidia)。气生分生孢子一般壁厚,大小较均匀,首尾相接排成长链(梁宗琦 2013)。因为其生产工艺简单,耐逆性好,是生防真菌制剂最常用的活性成分(Mascarin *et al.* 2019);生防真菌在营养丰富的液体中培养时,尤其在有机氮源存在条件下,先进行营养菌丝体的生长,后通过菌丝出芽或菌丝缢缩的方式产生单细胞繁殖体,称为芽生孢子(blastospore) (Fargues *et al.* 2002)。芽生孢子实质上是短菌丝,壁薄,大小差异很大且形状多变,呈长杆状,一般耐逆性较差,不耐储藏(Pereira & Roberts 1990),只有少数生防真菌制剂采用芽生孢子作为活性成分(Iwanicki *et al.* 2020);液生分生孢子(submerged conidia)在营养较贫瘠的液体培养基中产生,形成方式多样,如 *Beauveria bassiana* 的液生分生孢子形成方式有 3 种,第一种为芽生孢子直接形成产孢细胞产生液生分生孢子;第二种方式是在菌丝上直接产生液生分生孢子,或者在菌丝上产生短孢子梗,顶生一个液生分生孢子;第三种方式为在菌丝上产生分生孢子梗,分生孢子梗上长出小梗,小梗上着生液生分生孢子(宋漳 2005)。液生分生孢子大多呈卵圆形或梭形,细胞壁光滑,且耐逆性不如气生分生孢子强(宋文婧 2011)。目前,少有液生分生孢子制成生防真菌制剂的报道(Iwanicki *et al.* 2023)。

真菌不同类型的孢子在形态、表面超微结构、疏水性及黏附性方面有差异。如 Bidochka *et al.* (1995)研究表明,在 *Botrytis bassiana* 的气生分生孢子和液生分生孢子细胞壁最外层的小棒层中存在一种疏水蛋白使其呈现疏水性。*B. bassiana* 的气生分生孢子易与疏水性表面结合,对极性表面的粘附力很差;而芽生孢子表面具有亲水性,可以快速和亲水表面结合;液

生分生孢子的疏水性介于气生分生孢子和芽生孢子之间,既可以和疏水表面结合,也能和亲水表面以及弱极性表面结合(Holder & Keyhani 2005; Holder *et al.* 2007)。不同类型的孢子由于大小、表面电荷、双电层的厚度有差异,在不同 pH 条件下 Zeta 电位值变化范围也不同,当 pH 值为 3–9 时, *B. bassiana* 气生分生孢子的 Zeta 电位分布范围为+22 mV 至–30 mV,液生分生孢子的电位分布范围为+10 mV 至–13 mV,而芽生孢子的 Zeta 电位变化为+4 mV 至–4 mV (Holder *et al.* 2007), Zeta 电位绝对值越大,孢子越能稳定的分散。此外,同一真菌不同类型的孢子的杀虫活性也有差异,如 *B. bassiana* ESALQ3760 菌株的液生分生孢子与气生分生孢子和芽生孢子相比,能更快地杀死棉铃象甲成虫(Iwanicki *et al.* 2023);而 *B. bassiana* 芽生孢子对亚洲飞蝗的 LT_{50} 略高于液生分生孢子和气生分生孢子(Hegedus *et al.* 1992)。综上所述,不同类型的孢子表面特性、耐逆性和毒力方面均有显著差异,且液生分生孢子在量产和应用方面都有一定的潜力,但关于爪哇虫草液生分生孢子的生产和特性分析鲜有报道。

本文通过控制发酵条件诱导爪哇虫草 IF-1106 产生液生分生孢子,比较其与气生分生孢子、芽生孢子在形貌、表面特性和耐逆性方面的差异。统计 3 种孢子的粒度分布,并通过扫描电镜和透射电镜对其表面形貌和切面进行观察;其次,采用 MATH 方法测定不同类型孢子的疏水性;再次,测定 3 种孢子在不同 pH 条件下的 Zeta 电位变化;最后,测定 3 种孢子的萌发速率、耐热和耐紫外特性,以论证爪哇虫草孢子作为生防制剂活性成分的潜力,为开发新型的生防制剂提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源及保藏条件

爪哇虫草 *Cordyceps javanica* IF-1106, 保

藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心, 保藏编号: CGMCC No.7514。以磁珠菌种保藏管保存于 -20°C 。

1.2 孢子悬浮液制备

将保藏的菌株取出活化后接种在 PDA 培养基上, 于 25°C 培养 10 d 备用。在无菌条件下, 在产孢良好的 PDA 平板中加入适量 0.1% (体积比) 的 Tween-80 水溶液, 用刮板轻刮收集气生分生孢子, 过滤除掉菌丝和培养基残物, 得到气生分生孢子悬浮液, 取一部分悬浮液于 5 000 r/min 离心 10 min 得到气生分生孢子沉淀。另取一部分悬浮液, 调整孢子悬浮液浓度为 1×10^7 个/mL 作为液体培养的接种液。以 5% (体积比) 的接种量将气生分生孢子悬浮液接种至液生分生孢子培养基(蔗糖 30 g/L、 NaNO_3 8.0 g/L、 KH_2PO_4 1.0 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6.32 mg/L、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.1 mg/L、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.23 mg/L、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 3.5 mg/L) (Gestel 1983) 中, 25°C 、160 r/min 培养 4 d。取适量发酵液于 5 000 r/min 离心 10 min 得到液生分生孢子沉淀。以 10% (体积比) 的接种量将气生分生孢子悬浮液接种至芽生孢子培养基(蔗糖 40 g/L、酵母粉 10 g/L、 KH_2PO_4 5.0 g/L) 中, 25°C 、160 r/min 培养 32 h, 取适量发酵液于 5 000 r/min 离心 10 min 得到芽生孢子沉淀。

1.3 扫描电镜和透射电镜样品预处理

将 1.2 中获得的气生分生孢子、芽生孢子和液生分生孢子沉淀加入戊二醛, 室温固定 2 h。固定好的样品用 0.1 mol/L PB (pH 7.4) 漂洗 3 次, 每次 15 min。漂洗后的孢子依次经过 30% $\rightarrow$ 50% $\rightarrow$ 70% $\rightarrow$ 80% $\rightarrow$ 90% $\rightarrow$ 95% $\rightarrow$ 100% $\rightarrow$ 100%乙醇漂洗, 每次 15 min。再用乙酸异戊酯脱水处理 15 min。之后将孢子放入临界点干燥仪(Quorum, K850)内进行干燥。干燥后将孢子紧贴于导电碳膜双面胶上, 放入 MC1000 (Hitachi) 离子溅射仪样品台上喷金 30 s 左右。用 SU8100 (Hitachi) 扫描电子显微镜观察采图。

3 种孢子沉淀用戊二醛于 4°C 固定 2–4 h 后, 用 0.1 mol/L PB (pH 7.4) 漂洗 3 次, 每次 15 min。漂洗后的孢子依次经过 50% $\rightarrow$ 70% $\rightarrow$ 80% $\rightarrow$ 90% $\rightarrow$ 95% $\rightarrow$ 100% $\rightarrow$ 100%乙醇, 100%丙酮–100%丙酮进行脱水, 每次 15 min。采用丙酮: 812 包埋剂(1:1)渗透 2–4 h, 采用丙酮: 812 包埋剂(2:1)渗透过夜, 最后用纯 812 包埋剂渗透 5–8 h。将渗透好的样品插入包埋板中, 加入纯 812 包埋剂, 在 37°C 烤箱中过夜。在 60°C 烤箱聚合 48 h 进行包埋。使用 Leica UC7 超薄切片机制作 60–80 nm 超薄切片。采用铀铅双染色(2%醋酸铀饱和乙醇溶液和枸橼酸铅), 切片染色 15 min, 在室温下干燥一夜。用 HT7800 (日立) 透射电子显微镜观察, 采集图像分析。

1.4 孢子粒径测定

将 1.2 中获得的气生分生孢子、芽生孢子和液生分生孢子沉淀, 加入适量无菌水, 制备成孢子悬浮液, 调整孢子浓度为 1×10^7 个/mL。在显微镜下观察 3 种孢子悬浮液, 采集图像, 用 Nano Measurer 软件(吕汉强等 2022) 分析统计图像中孢子的粒径, 每种类型选择 300 个孢子进行粒径测定和统计。

1.5 孢子疏水性测定

1.5.1 孢子碳氢吸附能力(MATH)测定

碳氢吸附能力测定参考 Holder *et al.* (2007) 的方法。将 1.2 中得到的气生分生孢子、芽生孢子和液生分生孢子洗涤到 PUM 缓冲液中(K_2HPO_4 22.2 g/L、 KH_2PO_4 7.26 g/L、尿素 1.8 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, pH 7.1), 制备成悬浮液。将悬浮液调节至 A_{470} (在波长 470 nm 下的吸光度) 为 1.2, 取 4.5 mL 置于试管中, 添加 1.5 mL 十六烷, 涡旋 3 次, 每次持续 30 s。在室温下放置 15 min, 小心去除十六烷相, 将试管冷却至 4°C , 去除残留的固化十六烷, 放置至室温, 使用分光光度计测定 3 种孢子悬浮液在 470 nm 处的吸光度 A'_{470} , 疏水指数 $= (1.2 - A'_{470}) / 1.2$ 。每个处理设置 3 个重复, 试验结果取平均值。

1.5.2 孢子悬浮液接触角测定

将 1.2 中得到的气生分生孢子、芽生孢子和液生分生孢子用无菌水稀释到 1×10^7 个/mL, 制备成孢子悬浮液, 使用 JC2000D1 接触角仪测定 3 种孢子悬浮液的接触角。每种孢子悬浮液设置 3 个重复, 每个重复取 10 滴进行测定, 试验结果取平均值。

1.5.3 Zeta 电位测定

将 1.2 得到的气生分生孢子、芽生孢子和液生分生孢子用无菌水稀释到 1×10^7 个/mL, 用 HCl 和 NaOH 调节孢子悬浮液的 pH 分别为 3、4、5、6、7、8、9, 使用 JS94H 型微电泳仪测定孢子 Zeta 电位。每种孢子悬浮液设置 3 个重复, 每个 pH 测定 6 次, 试验结果取平均值。

1.6 孢子耐逆性测定

将 1.2 得到的气生分生孢子、芽生孢子和液生分生孢子用萌发液(2%葡萄糖、1%蛋白胨)稀释到 1×10^7 个/mL。采用水浴加热法将配制好的 3 种孢子悬浮液于 45 °C 分别处理 1、1.5、2、2.5、3 h, 置于 25 °C 下培养, 观察孢子萌发情况, 芽管长度超过孢子直径一半视为萌发, 统计孢子萌发率(李义华 2022)。每个处理重复 3 次, 每次观察 3 个视野, 试验结果取平均值。以未经热处理的孢子萌发率为对照。

取孢子悬浮液置于无菌培养皿中, 于紫外交联仪辐照箱中进行 UV-B (波长 312 nm) 照射, 设置辐照能量分别为 1、2、3、4、5 J/cm²。将辐照后的孢子悬浮液移至离心管中, 在 25 °C、160 r/min 恒温摇床中培养 6 h, 观察孢子萌发情况, 芽管长度超过孢子直径一半视为萌发, 统计孢子萌发率(张月容 2022)。每个处理设置 3 个重复, 每次观察 3 个视野, 试验结果取平均值。以未经辐照处理的孢子萌发率为对照。

1.7 数据处理和分析

所有统计分析均使用 SPSS 26.0 (IBM) 软件进行。采用单因素方差分析(one-way ANOVA) 进行差异显著性分析($P < 0.05$)。

采用 Origin 2022 软件对热处理后孢子的萌发率数据进行拟合。孢子的萌发指数(I_g)-处理时间(t)以模型 $I_g = 1/[1 + \exp(a+bt)]$ 进行拟合, 求出 I_g 为 0.5 时所对应的处理时间, 即计算得到 GT₅₀ 值, 作为孢子耐热性的评价指标。其中, 萌发指数(I_g)为经热处理的孢子与未经热处理的孢子萌发率之比; b 为孢子萌发率随热处理时间的下降速率; GT₅₀ 为 I_g 为 0.5 时, $GT_{50} = -a/b$ 。

采用 Origin 2022 软件对紫外辐照处理后孢子的萌发率数据进行拟合。对紫外辐照能量梯度-菌株孢子萌发率曲线进行单指数衰减曲线方程(ExpDec1)非线性拟合分析。单指数衰减模型 Expdec1 模型方程式为: $y = B + A \exp(-x/C)$, 其中自变量 x 为辐照剂量(J/cm²), y 为萌发率(%), A 、 B 和 C 为拟合常量, GD₅₀ 表示 y 为 50% 时所对应的紫外辐照能量, GD₅₀ 越大代表孢子在试验条件下对 UV-B 的紫外耐受性越好。

2 结果与分析

2.1 爪哇虫草 IF-1106 3 种孢子形态观察和粒径分析

3 种孢子在形态和大小上显著不同(图 1A, 1B, 1C), 气生分生孢子粒径范围为 2.35–8.65 μm, 粒径为 4.1–4.8 μm 的气生分生孢子数目最多, 占比为 32.69%, 平均粒径为 4.45 μm (图 1D)。芽生孢子的粒径范围为 4.47–18.87 μm, 35.76% 的芽生孢子粒径在 6.8–8.2 μm 区间内, 平均粒径为 7.67 μm (图 1E)。液生分生孢子的粒径在 2.43–10.23 μm 范围内, 37.31% 的液生分生孢子粒径集中在 3.8–4.7 μm, 平均粒径为 4.17 μm (图 1F), 粒径大小顺序为芽生孢子 > 气生分生孢子 > 液生分生孢子, 气生分生孢子和液生分生孢子的粒径分布较均匀, 而芽生孢子的粒径变化较大。

为了更清晰地观察 3 种孢子的表观形貌, 采用扫描电镜对 3 种孢子进行观察(图 2A–2C)。气生分生孢子呈梭形, 梭形两端的形状不一

致，一端具有平面，疑为产痕。气生分生孢子较干瘪，表面粗糙，似有磨绒物质覆盖，类似于疏水小棒层(Bidochka *et al.* 1995)。表面未观察到裂痕，推测其细胞壁柔韧性好，在固定和脱水干燥的制样过程中不会开裂。

芽生孢子呈棒状或柱状，有些无分节，有些分为两节。芽生孢子的两端形状也不一致，一端呈平面，疑似为产痕。芽生孢子细胞壁表面较光滑，均具有明显裂痕，推测细胞壁在脱水过程中失去水分而发生龟裂。

液生分生孢子呈卵形，个体较小，且卵形孢子的两端也呈现不同的形态，一端仍保留其他类型的孢子均具备的类似产痕的结构。未观察到孢子的分节现象，但有些孢子表面有数个圆垫形结构分布，似酵母细胞出芽后留下的芽痕。液生分生孢子细胞壁表面更为光滑，少数

出现细小的裂纹，推测液生分生孢子细胞壁的柔韧性优于芽生孢子，在同样的脱水操作中细胞壁未出现明显龟裂。

通过透射电镜观察孢子切面状态，可见细胞内有细胞核、线粒体、脂肪粒，内质网、液泡等细胞器(图3)，其中芽生孢子细胞内还普遍出现不规则云团状物质。需要特别注意的是，3种孢子的细胞壁厚度有显著差异，其中气生分生孢子的细胞壁较厚，芽生孢子的细胞壁最薄。还可以发现，不同类型的孢子细胞壁外层的绒毛层形态有明显差异，气生分生孢子细胞壁外层是较厚的绒毛层，而芽生孢子和液生分生孢子细胞壁外层的绒毛层较短，芽生孢子的绒毛层短而疏，液生分生孢子的绒毛层短而密，这与通过扫描电镜观察到的液生分生孢子表面更光滑的现象相一致。

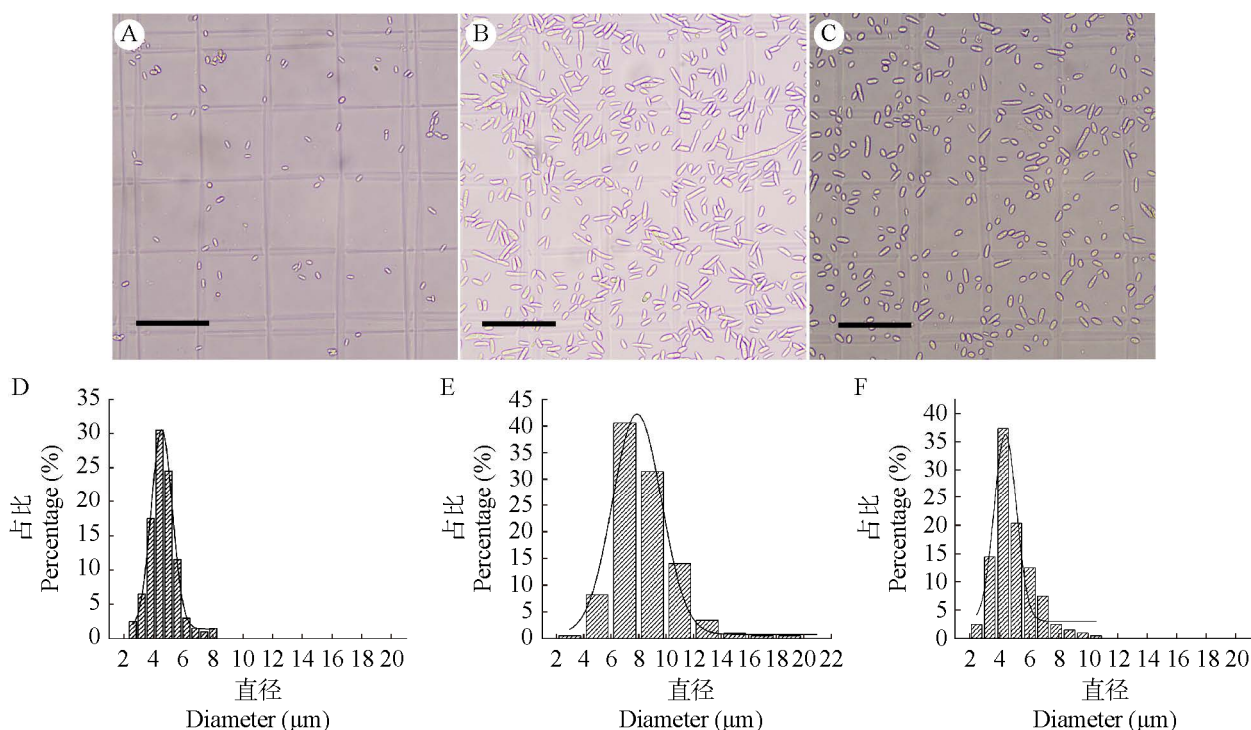


图1 爪哇虫草 IF-1106 气生分生孢子、芽生孢子和液生分生孢子显微形态及粒径分布 A, D: 气生分生孢子; B, E: 芽生孢子; C, F: 液生分生孢子. 标尺=50 μm

Fig. 1 Microscopic morphology and particle size distribution of aerial conidia, blastospores and submerged conidia of *Cordyceps javanica* IF-1106. A, D: Aerial conidia; B, E: Blastospores; C, F: Submerged conidia. Bars=50 μm.

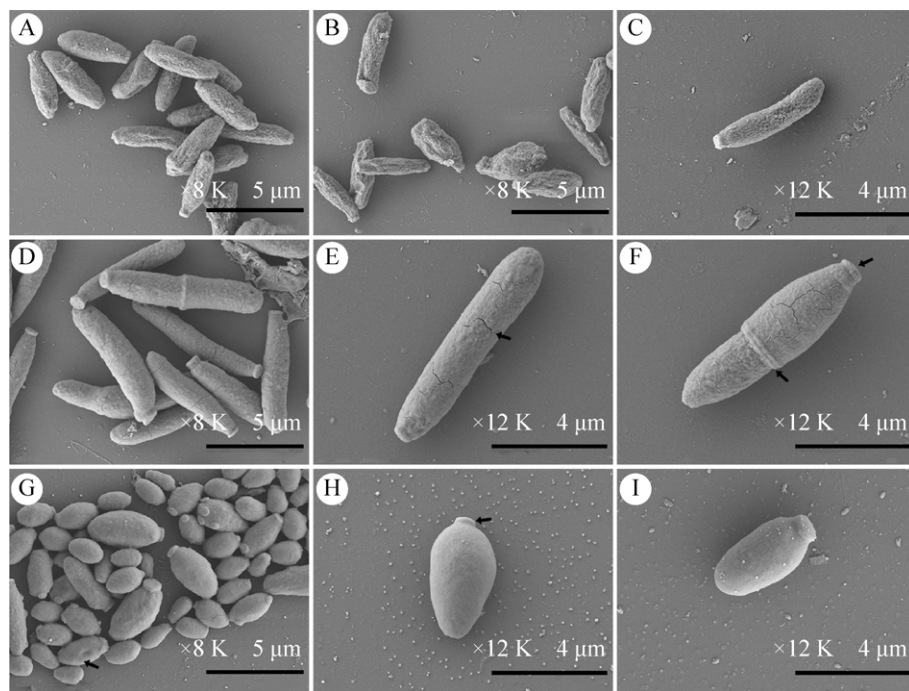


图 2 扫描电镜观察爪哇虫草 IF-1106 气生分生孢子、芽生孢子和液生分生孢子的形态 A–C: 气生分生孢子; D–F: 芽生孢子; G–I: 液生分生孢子

Fig. 2 Morphology of aerial conidia, blastospores and submerged conidia of *Cordyceps javanica* IF-1106 observed by SEM. A–C: Aerial conidia; D–F: Blastospores; G–I: Submerged conidia.

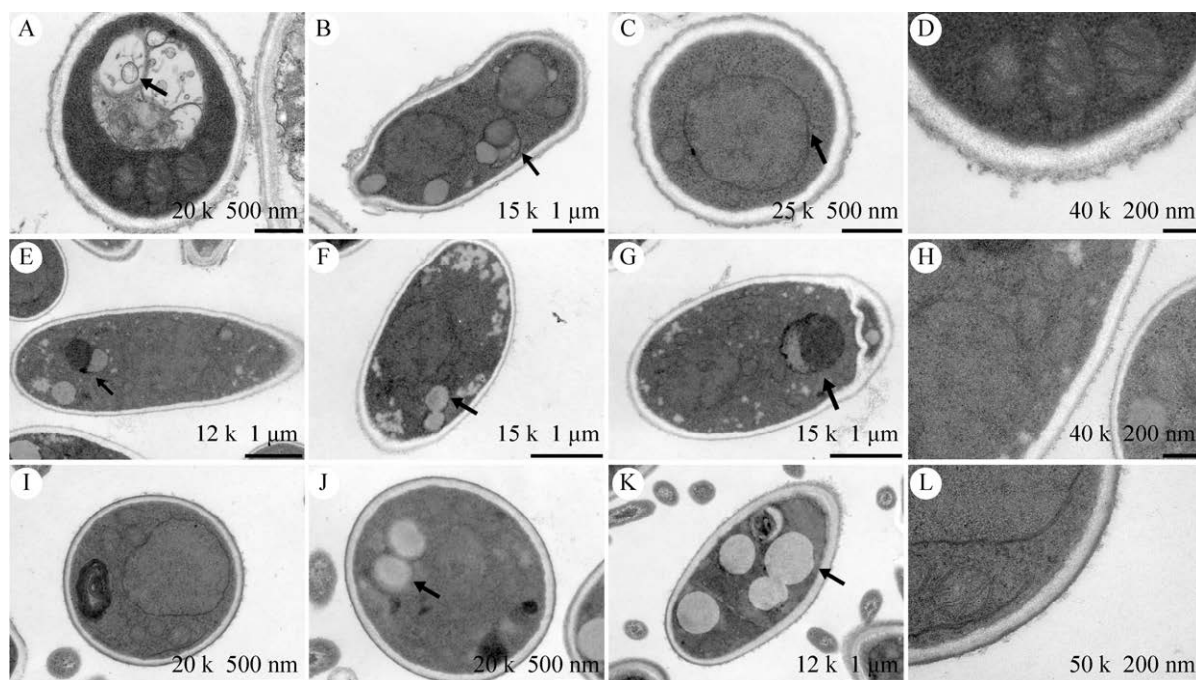


图 3 透射电镜观察爪哇虫草 IF-1106 气生分生孢子、芽生孢子和液生分生孢子的切面形态 A–D: 气生分生孢子; E–H: 芽生孢子; I–L: 液生分生孢子

Fig. 3 Transection morphology of aerial conidia, blastospores and submerged conidia of *Cordyceps javanica* IF-1106 observed by TEM. A–D: Aerial conidia; E–H: Blastospores; I–L: Submerged conidia.

2.2 爪哇虫草 3 种孢子的疏水性测定

孢子的细胞壁表面分布有亲水和疏水结构，不同类型的孢子亲疏水结构的比例不同，孢子总体呈现出的亲疏水性也有差别。碳氢吸附能力(MATH)测试结果显示气生分生孢子疏水指数为 0.84，液生分生孢子的疏水指数最小，为 0.59，而芽生孢子的疏水性介于两者之间，疏水指数为 0.78 (图 4)。可见 3 种孢子的疏水性顺序为气生分生孢子>芽生孢子>液生分生孢子。

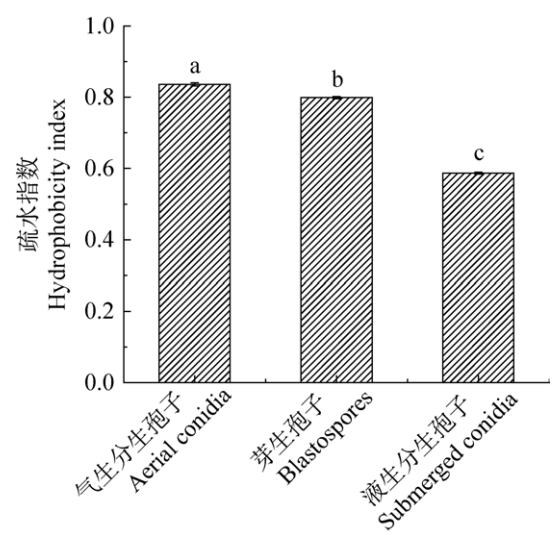


图 4 爪哇虫草 IF-1106 气生分生孢子、芽生孢子和液生分生孢子的碳氢吸附能力分析 数据代表平均值±标准差，不同字母表示在 α=0.05 水平上差异显著

Fig. 4 MATH assay of aerial conidia, blastospores and submerged conidia of *Cordyceps javanica* IF-1106. Data are means ± SD. Different lowercase letters indicate significant difference in one-way analysis of variance at α=0.05 level.

测定气生分生孢子、芽生孢子和液生分生孢子悬浮液接触角与表面张力(表 1)，气生分生孢子接触角最大，而表面张力值最小，可能是因为气生分生孢子可以聚集在水和空气的界面，降低了水溶液表面张力。芽生孢子和液生分生孢子则更多地分布在水溶液中，芽生孢子

表面活性居中，液生分生孢子的表面活性最低。这与碳氢吸附能力(MATH)测定的试验结果一致。

表 1 爪哇虫草 IF-1106 气生分生孢子、芽生孢子和液生分生孢子悬浮液的接触角与表面张力值

Table 1 Contact angle and surface tension in suspension of aerial conidia, blastospores and submerged conidia of *Cordyceps javanica* IF-1106

孢子类型	接触角	表面张力
Spore type	Contact angle	Surface tension
气生分生孢子	(82.25±1.85)° a	81.37±1.79 c
Aerial conidia		
芽生孢子	(81.88±0.8)° a	91.34±1.12 b
Blastospores		
液生分生孢子	(78.81±0.96)° b	97.13±2.49 a
Submerged conidia		

注：数据代表平均值±标准差，不同字母表示在 α=0.05 水平上差异显著。下同

Note: Data are means ± SD. Different lowercase letters indicate significant difference in one-way analysis of variance at α=0.05 level. The same below.

2.3 爪哇虫草不同孢子的 Zeta 电位测定

通过对比爪哇虫草气生分生孢子、芽生孢子和液生分生孢子在 pH 3–9 范围内的 Zeta 电位值(图 5)发现，气生分生孢子在 pH 为 3 时表现出最高的正 Zeta 电位(+2.68±0.73) mV，但在 pH 为 4 时迅速变为负电位(−1.46±0.27) mV，在 pH 为 9 时达到最大负电位值，为(−18.44±1.05) mV，拟合方程为 $y = -0.03x^3 + 0.62x^2 - 7.36x + 20.04$ ， $R^2 = 0.9824$ ，等电点 pH 为 3.63。芽生孢子在低 pH 时表现出正电位，pH 最小时电位值达到最大，为(+5.16±0.37) mV，在 pH 为 6 时转变为负电位值[−2.69±0.9) mV]，在 pH 为 9 时电位值达到(−5.51±1.67) mV，拟合方程为 $y = -0.04x^3 + 0.75x^2 - 6.28x + 18.07$ ， $R^2 = 0.8653$ ，等电点 pH 为 5.32。液生分生孢子在 pH 最小时电位值接近零电势 [(+0.39±1.13) mV]，而在 pH 为 4 时，电位值迅速变为负值[(−7.74±0.46) mV]，并在 pH 最高时电位值达到最高负值(−18.09±0.86) mV，拟合方程为 $y = -0.2x^3 + 4x^2 - 26.97x + 49.7$ ， $R^2 = 0.935$ 。在

pH=3.0 时, 3 种孢子表面均带正电荷, 且所带电荷芽生孢子>气生分生孢子>液生分生孢子。随着 pH 的升高, 3 种孢子所带正电荷逐渐减少, pH 继续升高, 则 3 种孢子表面均带上负电荷。气生分生孢子和液生分生孢子在 pH 不同条件下 Zeta 电位的变化趋势相似, 芽生孢子在 pH 3.0-9.0 时, 表面电荷变化较小, 说明其在水溶液中更容易聚集。液生分生孢子和气生分生孢子在碱性条件下, pH 越高 Zeta 电位越高则说明其在水溶液中越能稳定地分散。

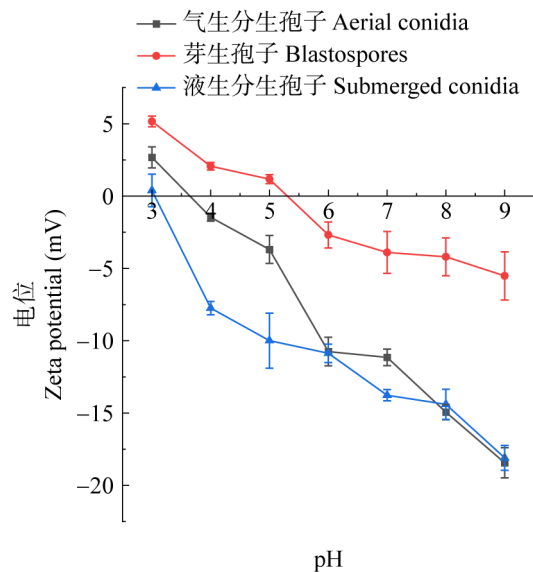


图 5 爪哇虫草 IF-1106 气生分生孢子、芽生孢子和液生分生孢子在不同 pH 下的 Zeta 电位变化
Fig. 5 Zeta potential of aerial conidia, blastospores and submerged conidia of *Cordyceps javanica* IF-1106 under different pH.

2.4 爪哇虫草 3 种孢子的萌发速率、耐热性和耐紫外辐射特性分析

3 种孢子的萌发速率各异(图 6), 芽生孢子最先萌发, 5 h 左右开始萌发, 9 h 萌发率已达 90%以上, 在 10 h 萌发率达到 100%; 气生分生孢子的萌发速度最慢, 在 7 h 左右才观察到萌发, 10 h 时仅有 10%左右的孢子萌发, 随后萌发率迅速提高, 14 h 萌发率达到 100%; 而液生分生孢子的萌发速率介于两者之间, 在 6 h

时开始萌发, 在 10 h 时萌发率达到 90%以上, 在 11 h 后孢子全部萌发。

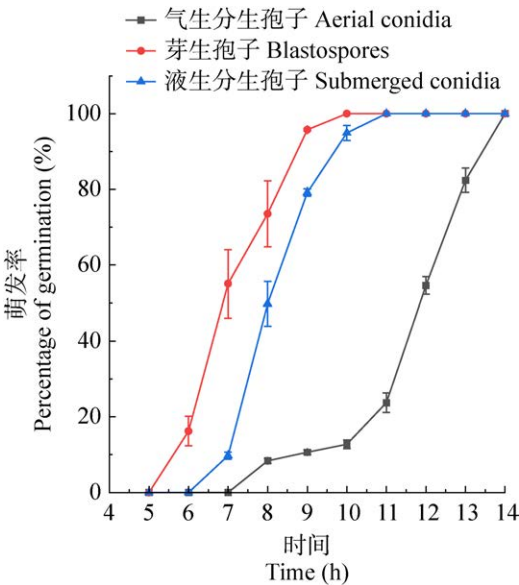


图 6 爪哇虫草 IF-1106 气生分生孢子、芽生孢子和液生分生孢子的萌发速率
Fig. 6 Germination rate of aerial conidia, blastospores and submerged conidia of *Cordyceps javanica* IF-1106.

对 3 种孢子进行热处理, 随着热处理的时间增加, 3 种孢子的萌发指数逐步下降(图 7), 从下降的斜率可以明显看出液生分生孢子和气生分生孢子的耐热性优于芽生孢子。拟合数据(表 2)也显示孢子热处理后半数萌发所对应的热处理时间, 即 GT₅₀ 有显著差异, 说明爪哇虫草的气生分生孢子、芽生孢子和液生分生孢子的耐热性有明显差异, 液生分生孢子的耐热性最好, GT₅₀ 为 1.41 h, 而芽生孢子的耐热性最差, GT₅₀ 为 0.91 h。

爪哇虫草 IF-1106 气生分生孢子、芽生孢子和液生分生孢子的耐紫外辐射特性也有显著差异, 液生分生孢子的耐紫外能力显著高于芽生孢子和气生分生孢子, GD₅₀ 为 2.80 J (表 3)。综上所述, 液生分生孢子萌发速率比气生分生孢子快, 接近芽生孢子, 且耐热性和耐紫外辐射特性均优于芽生孢子和气生分生孢子。

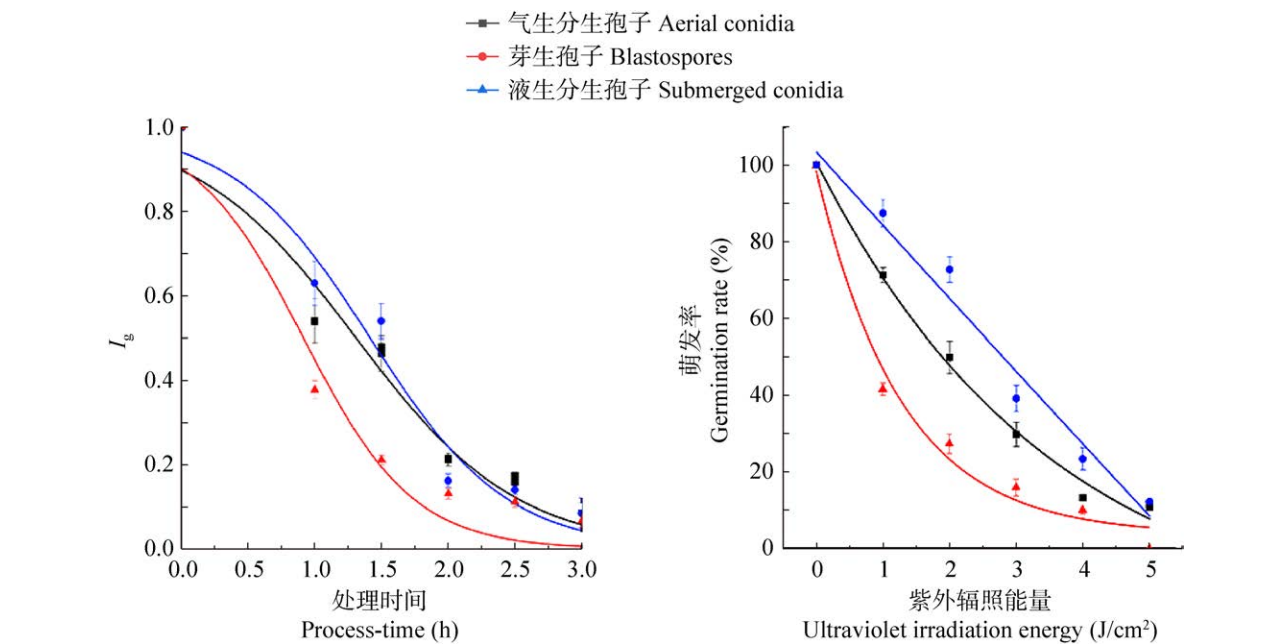


图 7 爪哇虫草 IF-1106 3 种孢子热处理萌发指数-处理时间与 UV-B 紫外辐照能量-萌发率单指数衰弱模型拟合

Fig. 7 The germination index-treatment time and UV-B irradiation energy-germination rate ExpDecl model fitting to three types of spores of *Cordyceps javanica* IF-1106.

表 2 爪哇虫草 IF-1106 3 种孢子热处理萌发指数-处理时间拟合方程

Table 2 The germination index and treatment time fitting equation of three types of spores of *Cordyceps javanica* IF-1106

孢子类型 Spore type	萌发指数-处理时间拟合方程 Germination index-treatment time fitting equation	R^2	GT ₅₀ (h)
气生分生孢子 Aerial conidia	$I_g=1/(1+e^{(-2.16+1.65t)})$	0.948 7	1.31±0.02 b
芽生孢子 Blastospores	$I_g=1/(1+e^{(-2.22+2.42t)})$	0.937 8	0.91±0.02 c
液生分生孢子 Submerged conidia	$I_g=1/(1+e^{(-2.76+1.94t)})$	0.955 1	1.41±0.01 a

表 3 爪哇虫草 IF-1106 3 种孢子的 UV-B 紫外辐照能量-萌发率单指数衰弱模型拟合方程

Table 3 ExpDecl model fitting equation of UV-B irradiation energy-germination rate of three types of spores of *Cordyceps javanica* IF-1106

孢子类型 Spore type	单指数衰弱模型拟合方程 ExpDecl model fitting equation	R^2	GD ₅₀ (J)
气生分生孢子 Aerial conidia	$y=-0.23+1.23e^{(-x/3.57)}$	0.990 9	0.18±0.13 b
芽生孢子 Blastospores	$y=0.04+0.95e^{(-x/1.28)}$	0.976 1	0.91±0.02 c
液生分生孢子 Submerged conidia	$y=-40.03+41.07e^{(-x/213.69)}$	0.959 4	2.80±0.15 a

3 讨论与结论

真菌孢子表面的物理化学性质对其应用具有重要影响。如 *Candida strains* 孢子表面疏水性可以有效增加其毒力；*Aspergillus* 分生孢

子的疏水小棒层可以促进真菌孢子在宿主细胞表面的黏附，抵抗宿主的免疫反应(Paris *et al.* 2003; Hazen 2004; Singleton *et al.* 2005)。真菌孢子表面亲水性和疏水性是由其结构决定的，疏水性的昆虫病原真菌，如 *Nomuraea*

rileyi、*Metarhizium anisopliae* 和 *Paecilomyces fumosoroseus*, 都有小棒层, 而亲水性的真菌, 如 *Hirsutella thompsonii* 和 *Verticillium lecanii*, 无小棒层, 但在孢子成熟过程中会产生外层黏液(Boucias & Pendland 1991)。在本研究中, 使用 SEM 和 TEM 观察了爪哇虫草 IF-1106 3 种孢子的表面形态差异。其中气生分生孢子细胞壁表面有类似小棒层的超微结构, 其疏水性最强; 而液生分生孢子和芽生孢子表面光滑, 无明显的小棒层, 其疏水性较弱; 这与报道的规律相一致, 如 *Trichoderma harzianum* 气生分生孢子具有疏水性, 液生分生孢子具有亲水性(Munoz *et al.* 1995)。由此可见, 培养条件不仅影响孢子形态也影响孢子表面超微结构, 进而决定了其物理化学性质。孢子的疏水性影响真菌孢子与其他物质的键合特性。如 *Cryptosporidium oocystes* 亲水性的芽生孢子对亲水性的玻璃表面黏附性更强(Drozd & Schwartzbrod 1996)。而爪哇虫草 IF-1106 不同的类型孢子具有不同的表面特性, 这些特性可能会在不同的环境条件下呈现出一定的选择性优势, 此问题仍有待探索。

Zeta 电位(Zeta potential)是表征胶体分散系稳定性的重要指标。Zeta 电位是对颗粒之间相互排斥或吸引的强度的度量。分子或分散粒子越小且 Zeta 电位的绝对值越高, 体系越稳定。反之, Zeta 电位的绝对值越低, 粒子越容易凝结或凝聚。不同类型的孢子表面化学基团不同, 故所带电荷也有不同; 另一方面, 环境 pH 影响孢子表面基团的解离状态从而影响孢子表面电荷。*B. bassiana* 气生分生孢子在中性 pH 条件下表面带负电荷(Holder & Keyhani 2005)。Zeta 电位随着 pH 的增加而降低, 这是因为随着 pH 的增加, 孢子悬浮液中的电解质浓度改变, 溶液中的 OH⁻ 离子浓度增加, 从而改变孢子的 Zeta 电位(张梦等 2017); 同一真菌不同类型的孢子表面电荷存在差异, *B. bassiana* 液生分生孢子

的表面电荷介于气生分生孢子和芽生孢子之间(Holder *et al.* 2007)。爪哇虫草 IF-1106 不同类型的孢子表面结构不同, 在相同 pH 条件下的 Zeta 电位也不同; 当 pH 变化范围相同时, 不同类型孢子表面电荷变化差异很大, 也说明了不同孢子表面基团存在明显差异, 这与 Holder *et al.* (2007)的研究结果相似, 气生分生孢子和液生分生孢子更容易受到外界离子环境的影响, Zeta 电位变化更显著, 可能是因为其表面基团丰富, 容易结合溶液中的 OH⁻ 离子。

昆虫病原真菌的快速萌发是高效防治害虫的关键, 且在田间使用真菌制剂时紫外线辐射、高温和低湿因素将影响昆虫病原真菌生长, 真菌应具有一定的耐逆能力以抵抗环境的不利因素(Fernandes *et al.* 2015)。Thomas *et al.* (1987)的研究结果表明 *B. bassiana* 的芽生孢子 8 h 即可萌发, 液生分生孢子 16 h 萌发, 而气生分生孢子 24 h 才萌发。这与本研究结果相似, 爪哇虫草 IF-1106 芽生孢子的萌发最快, 气生分生孢子最慢, 而液生分生孢子的萌发速度介于两者之间。爪哇虫草 IF-1106 液生分生孢子和气生分生孢子对紫外照射和热胁迫具有良好的耐受性, Bernardo *et al.* (2020)的研究也发现 *Metarhizium* 的气生分生孢子比芽生孢子更耐热和 UV-B 胁迫。

本研究对爪哇虫草的气生分生孢子、芽生孢子和液生分生孢子的形状大小、表面形貌、切面形态以及疏水性和表面电荷进行对比。气生分生孢子大小较均匀, 细胞壁外层具有绒毛层, 疏水性强, 萌发速率最慢, 但对紫外和热胁迫具有良好的耐受性; 芽生孢子粒径大, 表面较光滑, 疏水性介于气生分生孢子和液生分生孢子之间, 虽然萌发速率最快, 但细胞壁表面脆性强, 且对耐紫外照射和热胁迫的性能差。而液生分生孢子粒径与气生分生孢子类似, 大小较均匀, 细胞壁光滑, 在 3 种孢子中亲水性最强, 萌发速率接近芽生孢子, 但耐紫外和热胁迫的能

力最强,具有开发潜力。这些研究结果为爪哇虫草生防制剂的研究提供了依据。

作者贡献

高美瑜: 论文构思及撰写、试验及数据整理; 李俊梅: 试验及数据处理; 李义华: 数据分析、验证; 相会明: 提供实验材料; 马瑞燕: 提供实验平台、数据审核、提供实验平台; 周稳稳: 论文构思及撰写、实验指导、数据审核。

利益冲突

作者声明,该研究不存在任何潜在利益冲突的商业或财务关系。

[REFERENCES]

- Bernardo CDC, Pereira-Junior RA, Luz C, Mascarin GM, Fernandes EKK, 2020. Differential susceptibility of blastospores and aerial conidia of entomopathogenic fungi to heat and UV-B stresses. *Fungal Biology*, 124(8): 714-722
- Bidochka MJ, St Leger RJ, Joshi L, Roberts DW, 1995. An inner cell wall protein (cwp1) from conidia of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiology*, 141(5): 1075-1080
- Boucias DG, Pendland JC, 1991. Attachment of mycopathogens to cuticle: the initial event of mycoses in arthropod hosts. The fungal spore and disease initiation in plants and animals. Springer US, Boston, MA. 101-127
- Drozd C, Schwartzbrod J, 1996. Hydrophobic and electrostatic cell surface properties of *Cryptosporidium parvum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(4): 1227-1232
- Fargues J, Smits N, Vidal C, Vey A, Vega F, Mercadier G, Quimby P, 2002. Effect of liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity of the Hyphomycete, *Metarhizium flavoviride*. *Mycopathologia*, 154(3): 127-138
- Fernandes EK, Rangel DEN, Braga GUL, Roberts DW, 2015. Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. *Current Genetics*, 61(3): 427-440
- Gestel JFEV, 1983. Microcycle conidiation in *Penicillium italicum*. *Experimental Mycology*, 7(3): 287-291
- Hazen KC, 2004. Relationship between expression of cell surface hydrophobicity protein 1 (Csh1p) and surface hydrophobicity properties of *Candida dubliniensis*. *Current Microbiology*, 48(6): 447-451
- Hegedus DD, Bidochka MJ, Miranpuri GS, Khachatourians GG, 1992. A comparison of the virulence, stability and cell-wall-surface characteristics of three spore types produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 36(6): 785-789
- Holder DJ, Keyhani NO, 2005. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrata. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9): 5260-5266
- Holder DJ, Kirkland BH, Lewis MW, Keyhani NO, 2007. Surface characteristics of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana*. *Microbiology*, 153(10): 3448
- Iwanicki NS, Lopes ECM, Lira ACD, Poletto TB, Fonceca LZ, Junior I, 2023. Comparative analysis of *Beauveria bassiana* submerged conidia with blastospores: yield, growth kinetics, and virulence. *Biological Control*, 185: 105314
- Iwanicki NSA, Mascarin GM, Moreno SG, Eilenberg J, Delalibera JI, 2020. Growth kinetic and nitrogen source optimization for liquid culture fermentation of *Metarhizium robertsii* blastospores and bioefficacy against the corn leafhopper *Dalbulus maidis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(5): 71
- Kepler RM, Luangsa-Ard JJ, Hywel-Jones NL, Quandt CA, Sung GH, Rehner SA, Aime MC, Henkel TW, Sanjuan T, Zare R, Chen M, 2017. A phylogenetically-based nomenclature for *Cordycipitaceae* (*Hypocreales*). *IMA Fungus*, 8(2): 335-353
- Li YH, 2022. Effects of nutrients on the thermotolerance of *Cordyceps fumosorosea* and its mechanism. MS Thesis, Shanxi Agricultural University, Taigu. 1-73 (in Chinese)
- Liang ZQ, 2013. Flora fungorum sinicorum. Vol. 43 *Paecilomyces*, *Isaria*, *Taifanglania*. Science Press, Beijing. 1-154 (in Chinese)
- Lü HQ, Hu FL, Yu AZ, Su XX, Wang YL, Yin W, Chai Q, 2022. Microstructure characteristics of soil aggregates of maize farmland under different utilization patterns of green manure in a desert oasis area. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 30(6): 952-964 (in Chinese)
- Mascarin GM, Lopes RB, Delalibera Jr I, Fernandes EKK, Luz C, Faria M, 2019. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology*, 165(C): 46-53

- Munoz GA, Agosin E, Cotoras M, Martin RS, Volpe D, 1995. Comparison of aerial and submerged spore properties for *Trichoderma harzianum*. FEMS Microbiology Letters, 125(1): 63-69
- Paris S, Debeaupuis JP, Crameri R, Carey M, Charles F, Prevost MC, Scjmitt C, Philippe B, Latge JP, 2003. Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. Applied and Environmental Microbiology, 69(3): 1581-1588
- Pereira RM, Roberts DW, 1990. Dry mycelium preparations of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. Journal of Invertebrate Pathology, 56(1): 39-46
- Singleton DR, Fidel PL, Wozniak KL, Hazen KC, 2005. Contribution of cell surface hydrophobicity protein 1 (Csh1p) to virulence of hydrophobic *Candida albicans* serotype a cells. FEMS Microbiology Letters, 244(2): 373-377
- Song WJ, 2011. Morphogenesis of ten different entomogenous fungi in liquid culture. MS Thesis, Anhui Agricultural University, Hefei. 1-50 (in Chinese)
- Song Z, 2005. Submerged culture of *Beauveria bassiana* and its virulence test on *Dendrolimus punctatus*. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 11(1): 93-97 (in Chinese)
- Thomas KC, Khachatourians GG, Ingledew WM, 1987. Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. Canadian Journal of Microbiology, 33(1): 12-20
- Vega FE, Jackson MA, McGuire MR, 1999. Germination of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* on the cuticle of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. Mycopathologia, 147(1): 33-35
- Wang D, 2023. The infection mechanism of *Cordyceps javanica* IJ-tg19 strain on pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. PhD Dissertation, Shanxi Agricultural University, Taigu. 1-108 (in Chinese)
- Zhang M, Yu H, Wang XL, Song J, Wu FY, Pan XH, 2017. Research on Zeta potential of ultrafiltration membrane. Journal of Salt Science and Chemical Industry, 46(1): 9-11 (in Chinese)
- Zhang YR, 2022. Study on fermentation conditions of *Cordyceps fumosorosea* IF-1106 based on mycelial growth, sporulation and UV resistance enhancement. MS Thesis, Shanxi Agricultural University, Taigu. 1-58 (in Chinese)
- [附中文参考文献]
- 李义华, 2022. 营养成分对玫烟色虫草耐热性的影响及其机理初探. 山西农业大学硕士论文, 太谷. 1-73
- 梁宗琦, 2013. 中国真菌志. 第四十三卷, 拟青霉属 棒束孢属 戴氏霉属. 北京: 科学出版社. 1-154
- 吕汉强, 胡发龙, 于爱忠, 苏向向, 王玉珑, 殷文, 柴强, 2022. 荒漠绿洲区不同绿肥还田方式下玉米农田土壤团聚体微结构特征. 中国生态农业学报, 30(6): 952-964
- 宋文婧, 2011. 十种不同虫生真菌芽生孢子的形态发生过程和方式. 安徽农业大学硕士论文, 合肥. 1-50
- 宋漳, 2005. 白僵菌分生孢子深层培养及其对马尾松毛虫的毒力. 应用与环境生物学报, 11(1): 93-97
- 王迪, 2023. 爪哇虫草 IJ-tg19 对豌豆蚜的侵染机制. 山西农业大学博士论文, 太谷. 1-108
- 张梦, 于慧, 王旭亮, 宋杰, 吴非洋, 潘献辉, 2017. 超滤膜表面 Zeta 电位测试方法研究. 盐科学与化工, 46(1): 9-11
- 张月容, 2022. 基于菌丝生长、产孢及紫外耐逆性提升的玫烟色虫草发酵条件研究. 山西农业大学硕士论文, 太谷. 1-58