

飞虱虫疔霉黍米培养及其生物学特性

冯明光^{①②} 梁 勇^①

(浙江大学^①微生物研究所; ^②应用昆虫学研究所, 杭州 310029. mgfeng@cls.zju.edu.cn)

摘要 采用黍米(*Panicum miliaceum*)作为营养基质, 对侵染飞虱、叶蝉及蚜虫的飞虱虫疔霉(*Pandora delphacis*)进行固体培养实验. 将菌丝生物量约为 25 mg/mL 的菌丝液按 20% 的比例(体积重量比)接入经高温湿热灭菌而适度熟化、含水量为 45% 的黍米中, 在 25℃ 和 12L:12D 条件下直接培养, 所获 3~17 d 黍米培养物的产孢潜能和有效产孢时间因培养天数不同而异. 以培养 5 d 的黍米产孢量最大, 达 $(17.12 \pm 1.31) \times 10^4$ 个/粒, 培养 7~11 d 的黍米产孢量为 $13.00 \times 10^4 \sim 13.90 \times 10^4$ 个/粒. 相对于新鲜蚜尸 $(2.32 \pm 0.34) \times 10^4$ 个/头的平均产孢量和 ≤ 60 h 的有效产孢时间, 5~11 d 黍米培养物的产孢潜能高出 5.6~7.4 倍, 有效产孢时间(144 h)延长 2 倍以上. 将 106 头桃蚜(*Myzus persicae*)成蚜暴露在黍米培养物中 2 h 后接种, 7 d 内的感病死亡率为 69.8%, 而对照蚜虫中无一染病死亡. 结果表明, 飞虱虫疔霉黍米培养物的生物学性状类似于该菌侵染致死的蚜尸, 而且每颗米粒的产孢潜能和有效产孢时间远优于天然蚜尸, 可作为虫霉病传播源而成为天然虫尸的模拟物.

关键词 虫霉 飞虱虫疔霉 黍稷 固体培养 产孢潜能 杀蚜活性

在昆虫病原微生物中, 虫霉目(Entomophthorales)真菌的许多种类能够通过引发高强度的昆虫流行病而发挥控制害虫的作用, 尤其是绝大多数虫霉具有主动弹射孢子而侵染活体寄主并在害虫种群中传播的能力, 使其成为害虫流行病研究与微生物防治的重要资源^[1~3].

目前, 我国已发现 66 种虫霉目真菌, 约占全世界已知虫霉种数的 1/6 左右^[1,4]. 其中, 虫霉科(Entomophthoraceae)的虫疔霉(*Pandora* spp)和虫瘟霉(*Zoophthora* spp)一直是国内外研究的重点, 其诱发多种害虫流行病及控制害虫的潜力已被人们充分认识^[5~9], 但利用它们进行害虫微生物防治的研究却一直进展缓慢. 由于菌体大量繁殖困难, 有限的应用研究仅见于将感染虫霉的寄主引种定殖^[10]及通过室内活体接种获得大量虫尸, 再将虫尸或虫尸粉引入害虫种群中诱发病害^[11,12]. 欧洲联盟国家曾于 20 世纪 80 年代初开展利用新蚜虫疔霉(*Pandora neoaphidis* (Ramaudière & Hennebert) Humber)防治蚜虫的合作研究, 证明在温室或田间直接施用人工菌丝液的方法不适于虫霉^[13~15]. 虫霉是靠虫尸体内的菌丝长出体表后形成分生孢子梗产生和弹射分生孢子而感染周围的寄主, 液体培养的菌丝在适当条件下也能分化形成分生孢子梗而产生分生孢子, 但菌丝和孢子对环境条件均极为敏感^[3]. 因此, 国内外学者近年尝试将液培菌丝嵌入高分子基质中制成虫霉菌丝的凝

胶颗粒, 在一定程度上能保持虫霉的虫尸状产孢特性^[16~18]. 这种新方法虽然在工艺设计上充分考虑了虫霉的生物学特性, 但工艺难度大, 成本较高, 而且后续干燥和保存的技术瓶颈仍未突破.

虫疔霉和虫瘟霉都是专性昆虫病原真菌, 可人工分离培养和保存^[19], 甚至可用较简单的液体培养方法生产菌丝体^[20,21], 但虫疔霉的培养一般难于虫瘟霉. 由于液体培养的虫霉菌丝很难直接应用, 菌丝凝胶化的方法又过于复杂和昂贵, 能否找到既符合虫霉生物学要求又经济实用的虫霉侵染体繁殖方法, 是利用虫霉控制害虫的应用研究能否有所突破的关键所在. 本文针对能侵染蚜虫和飞虱等翅目害虫和生态适应性较强的飞虱虫疔霉(*Pandora delphacis* (Hori) Humber)^[22,23], 探索用黍米(俗称“黄米”)作为营养基质固体培养和繁殖该菌的新方法, 以获得具有虫霉生物学及流行学功能的模拟虫尸材料, 为虫霉的研究和利用提供有益的经验.

1 材料与方法

(i) 菌种与菌液的制备. 所用飞虱虫疔霉菌株 F95129 系本实验室 1995 年自杭州郊区晚稻上自然病死的褐稻虱(*Nilaparvata lugens* Stål)上分离纯化而得, 在 3℃ 下黑暗保存于 OS-SDAY 斜面上, 每半年转接一次^[19]. 保藏的菌种在牛奶蛋黄培养基平板上活化培养(20℃, L:D=12:12) 7 d, 菌落挑碎转入 30 mL

萨氏培养液(SDB: 含葡萄糖 4%, 蛋白胨 1%及酵母粉 1%)中振荡(150 r/min)培养(25℃)2 d后, 再将每 10 mL 菌液转入 80 mL SDB 中扩大培养 2 d, 即获得用于后述实验的菌丝液。

(ii) 固体培养. 从杭州农贸市场购得黍米(*Panicum miliaceum* L, 英文名为 broomcorn millet), 温水(~50℃)浸泡 2 h 或室温浸泡 16 h 后洗净晾干, 分装于容量为 100 mL 的三角瓶中(10 g/瓶), 经高温湿热灭菌(121℃, 16 min)后自然冷却至室温. 然后, 于每瓶灭菌黍米中加入液体培养的菌丝液(含菌丝生物量 25 mg/mL)2 mL, 充分混匀后, 瓶口加盖可透气瓶塞, 在光照培养箱(25℃, 12L: 12D)中静止培养 20 d, 其间不作任何干扰处理。

(iii) 产孢潜能及时序测定. 从培养的第 3 d 起, 隔日任取 1 瓶黍米培养物, 从中任取 12 颗米粒. 将黍米单粒置于 2%水琼脂平板(Ø13 mm)的中央, 然后平板倒置在直径相同、高 10 mm 的凹底容器之上, 容器凹底中事先注入 100 µL 0.5%十二烷基硫酸钠(SDS)溶液. 此容器为一封闭式孢子采集装置, 是为准确测定单颗米粒培养物的产孢量而专门设计, 凹底中的 SDS 溶液可将米粒上弹射下来的初级分生孢子收集起来, 使真菌孢子很快失活(不萌发), 但又不致影响其形态^[24]. 然后, 将所有悬置单颗米粒培养物的采孢装置在光照培养箱(25℃, 12L: 12D)中培养, 每隔 24 h 更换凹底容器, 直至米粒培养物产孢结束. 每个凹底容器中的孢子液采用血球计数器在光学显微镜下观察计数 15 个 1 µL 液样中的孢子, 再换算为凹底容器中的孢子总数, 即为当日该米粒的产孢数; 将该米粒的逐日产孢数累计相加, 即得其产孢总量。

(iv) 杀蚜活性测定. 将带菌培养 10 d 的黍米按大致 1 cm 的间隔均匀摆放在 2%琼脂平板(Ø150 mm)上, 置于 25℃培养 24 h, 将进入产孢盛期的菌作为接种源. 用在甘蓝植株上饲养(20~24℃, 12L: 12D)的桃蚜(*Myzus persicae* (Sulzer))无翅成蚜作为试虫. 接种时, 将载有 30~40 头成蚜的离体叶片暴露在接种源的“孢子浴”中 2 h(接种剂量为 70 个孢子/mm²), 然后将蚜虫连同叶片一起移出, 放于光照培养箱(25℃, 12L: 12D)内的培养皿中饲养 7 d, 逐日观察死亡情况. 重复 3 次, 并设不接种的蚜虫作为对照. 对染病致死的新鲜蚜尸也进行产孢量和产孢时序的测定, 测定方法同米粒培养物, 共测蚜尸 16 头. 由于蚜虫产孢期较短, 每隔 12 d 更换凹底容器, 直到蚜尸产孢结束。

(v) 数据处理与分析. 不同天数黍米培养物的产孢总量及产孢时序的变异采用方差分析和 Tukey HSD 检验进行比较, 在计算机上用 DPS 数据处理系统^[25]软件完成。

2 结果与分析

2.1 培养物表观性状

黍稷卵圆形, 长 2.5~3.2 mm, 宽 2.0~2.6 mm, 厚 1.4~2.0 mm, 千粒重 3~10 g(图 1(a)). 加工去壳后呈淡黄色, 故俗称黄米(图 1(b)), 带糯性为黍, 非糯为稷. 本研究所用材料为糯性黍米. 经浸泡和蒸汽灭菌后, 黍米粒膨胀疏松, 实测含水量为 45%. 接入飞虱虫病菌液后, 菌体在米粒上生长良好, 培养 3 d 后即可见菌丝包裹米粒, 培养 1 周左右米粒上菌丝层变得致密(图 1(d)). 将长有菌丝的黍米在不含任何营养的水琼脂平板上培养, 数小时后即可见米粒上的菌丝分化长出分生孢子梗和囊状体并开始产孢, 弹射出的分生孢子散落在米粒周围, 积累形成的粉状物是虫霉特有的孢子晕现象(图 1(e)和(f)). 这种情形与感染飞虱虫病菌而死亡的蚜尸在保湿条件下的产孢状况(图 1(c))完全一致. 对水琼脂平板上的粉状物不作任何处理直接在显微镜下观察或棉蓝染色后压片镜检, 均显示飞虱虫病菌分生孢子的典型特征(图 1(g)和(h)). 由此可见, 飞虱虫病菌黍米培养物在分生孢子产生和弹射等生物学性状方面与病死虫尸完全一致, 即每颗米粒可视为一头人工模拟虫尸。

2.2 产孢潜能

飞虱虫病菌黍米培养物的产孢总量因培养天数不同而有极显著差异($F = 57.56, P < 0.01$), 但在相同培养天数的不同米粒之间却差异不显著($F = 0.99, P = 0.46$). 如图 2 所示, 在黍米上培养 5 d 的飞虱虫病菌产孢量最大, 达 $(17.12 \pm 1.31) \times 10^4$ 个/粒, 培养 7~11 d 的产孢量为 $13.00 \times 10^4 \sim 13.90 \times 10^4$ 个/粒, 但与培养 5 d 的最高产孢量差异不显著($P < 0.05$). 培养时间过短或过长, 产孢量均显著降低, 如培养 3 d 的平均产孢量为 $(9.65 \pm 0.88) \times 10^4$ 个/粒, 培养 13 d 的产孢量为 $(8.71 \pm 0.44) \times 10^4$ 个/粒, 培养 17 d 的产孢量为 $(3.55 \pm 0.24) \times 10^4$ 个/粒. 新鲜蚜尸的平均产孢量仅为 $(2.32 \pm 0.34) \times 10^4$ 个/头, 与 5~11 d 的黍米培养物相比, 相差 5.6~7.4 倍. 显然, 飞虱虫病菌黍米培养物即人工模拟虫尸的产孢潜能大大超过该菌直接侵染致死的蚜尸。

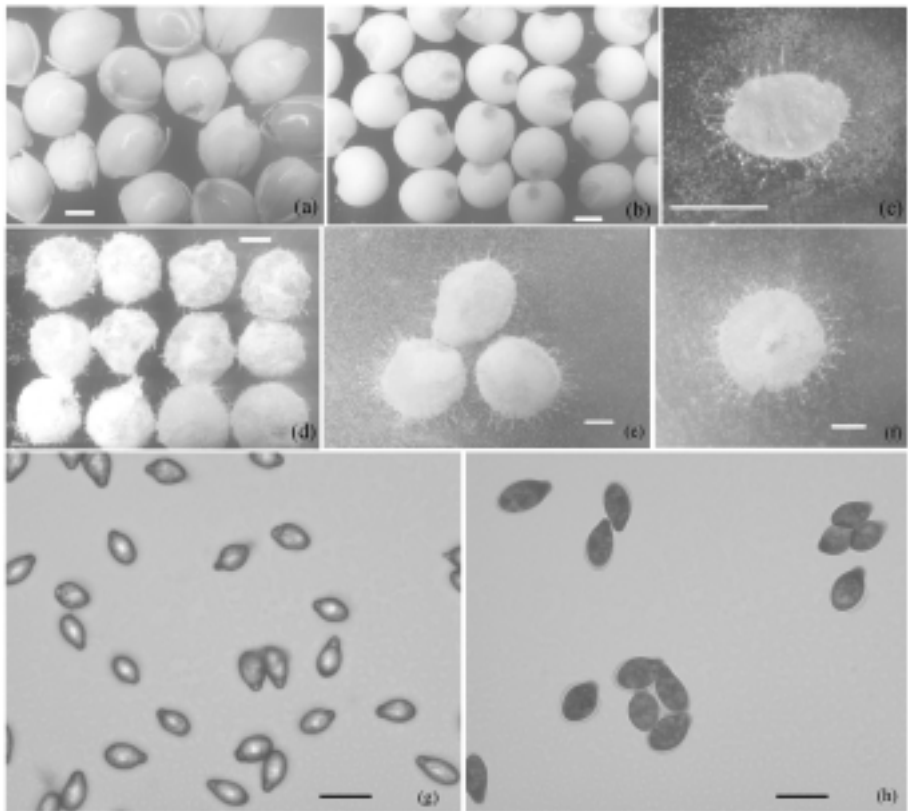


图 1 飞虱虫疔霉在黍米上的培养性状

(a) 黍稷籽粒; (b) 去壳黍米; (c) 被飞虱虫疔霉感染致死蚜尸的体表长出物及其向周围弹射的分生孢子, 示孢子晕; (d) 培养 1 周左右的黍米状态, 示黍米表面致密的菌丝层; (e) 和 (f) 黍米培养物在水琼脂平板上的产孢状态, 注意米粒表面的长出物及周围的粉状物并与 (c) 比较; (g) 水琼脂平板上粉状物的直接放大, 示分生孢子形态; (h) 粉状物棉蓝染色后压片观察, 示分生孢子的双囊壁结构. (a)~(f) 标尺示 1 mm; (g) 和 (h) 标尺示 20 μ m

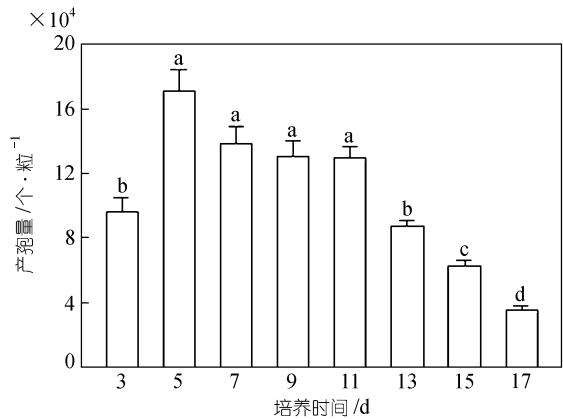


图 2 飞虱虫疔霉不同培养天数黍米培养物的产孢量
不同字母示 Tukey's HSD 检验的差异显著性 ($P < 0.05$)

2.3 产孢时序

在不含营养的水琼脂平板上复水培养期间, 不同日龄的飞虱虫疔霉黍米培养物在不同时段的产孢量, 总的趋势是逐日递减, 第 6 天后基本上终止产孢(图 3). 两因素方差分析表明, 不同日龄培养物在

不同时段的产孢量存在极显著差异(培养物日龄: $F = 178.20, P < 0.01$; 产孢时段: $F = 770.57, P < 0.01$). 首日产孢量占产孢总量的比例为 33.9%~50.7%, 日龄较长的培养物(≥ 13 d, 46.7%~50.7%)明显高于日龄较短的培养物(≤ 11 d, 33.9%~39.4%), 但绝对产孢量却是日龄适中(5~11 d)的培养物较高(图 3(a)~(h)). 次日的产孢量占总产孢量的 30%左右, 但不同日龄的培养物之间差异不明显. 第 3 天, 3~11 d 培养物的产孢量占总量的 15.7%~18.3%, 而 13~17 d 培养物的产孢量占总量的 8.5%~12.6%; 截至此日, 3~9 d 培养物的累计产孢量为 82.2%~86.9%, 11~17 d 培养物的累计产孢量则达到 91.0%~93.9%. 在第 4~6 天, 3~9 d 培养物的产孢量分别占产孢总量的 6.8%~9.5%, 4.6%~5.6%和 1.5%~3.6%, 而 11~17 d 的培养物仅分别占 3.3%~5.8%, 1.8%~2.7%和 1.0%~1.3%. 在保湿条件下, 新鲜蚜尸 24 h 内的产孢量占产孢总量的比例高达 88.6%, 48 h 内的累计产孢量已达 99.2%, 60 h 后基本上检测不到产孢(图 3(i)). 结果表明, 黍米培养物不仅每颗米粒的绝

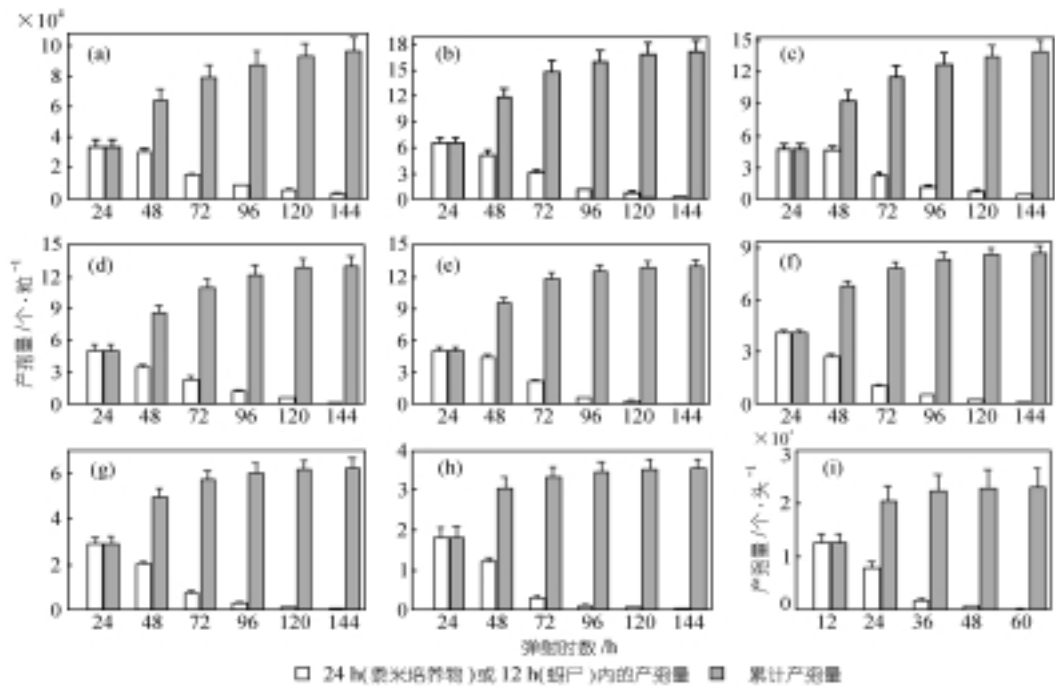


图 3 飞虱虫疔霉黍米培养物(a)~(h)与病死新鲜蚜尸(i)的产孢时序比较
(a)~(h) 3~17 d 培养物, 隔日取样观察; (i) 新鲜蚜尸每隔 12 h 取样

对产孢量数倍于蚜尸, 而且有效产孢时间比蚜尸提高 2 倍以上. 综合考虑绝对产孢量和有效产孢时间, 在 25℃ 时用黍米培养飞虱虫疔霉以 5~9 d 为宜.

2.4 杀蚜活性

用黍米培养物产生的飞虱虫疔霉分生孢子接种桃蚜成蚜 106 头, 在接种后第 3 天即有少数蚜虫死亡于典型的虫疔霉症, 随后 2 d 死亡数显著增多, 至接种后第 7 天, 共受感染死亡 74 头, 累计死亡率为 69.8%. 而同期观察不接受“孢子浴”处理的 110 头对照蚜虫中, 无一发生虫疔霉症死亡, 说明飞虱虫疔霉黍米培养物产生的分生孢子对桃蚜具有很强的侵染力, 与用该菌的液培菌丝作为接种源在同一量级接种水平下对桃蚜 2~3 龄若蚜的侵染力^[22]相近.

3 讨论

本研究结果表明, 用黍米作为营养基质固体法培养飞虱虫疔霉获得完全成功, 其方法简单, 成本低廉. 黍米粒比常见成蚜个体 (~2 mm) 略大, 但其培养物的产孢潜能却数倍于成蚜, 有效产孢时间也比天然蚜尸大幅延长, 而且所产孢子对蚜虫的侵染力保持了菌种的本色. 这充分说明黍米培养物具备了天然虫尸中虫霉的生物学功能, 米粒可作为独立的虫

霉侵染体源, 即相当于病死虫尸的模拟物. 这是关于用谷物固体法培养虫霉而成功制备人工模拟虫霉病虫尸的首次报道.

作为专性昆虫病原真菌的虫疔霉对营养条件的要求一般比较苛刻, 在常规条件下培养相当困难, 故通常采用加牛奶蛋黄的萨氏培养基进行分离和离体培养^[1,3]. 欧洲学者的研究^[26~28]表明, 蛋黄并不含有虫霉生长所需的特殊营养成分, 蛋黄对虫霉生长特殊的促进作用被认为主要源于其中蛋白质和脂类成分之间天然合理的比例和状态而有利于虫霉吸收. 但是, 蛋黄虽可加入固体培养基中, 却因难溶于水而不能添加到液体培养基中, 致使虫霉的液体培养状态欠佳, 菌丝得率较低. 这一虫霉侵染体大量繁殖的技术难题长期阻碍着虫霉的研究与利用^[29]. 最近, 新蚜虫疔霉被证明能有效吸收培养液中经充分乳化的脂肪酸, 在培养液中加入适量乳化的植物油可明显提高该菌液体培养的质量^[21]. 在本研究中, 所用糯性黍米为营养丰富的杂粮, 含蛋白质 9.6%, 脂肪 0.9%, 碳水化合物 76.3% 以及丰富的矿物营养和维生素. 在未添加任何其他营养成分的条件下, 经高温湿热灭菌处理而适当熟化的黍米只是按 20% (体积重量比) 接入菌丝液 (含残留的葡萄糖、蛋白胨及酵母抽提

物),就能很好地培养飞虱虫疔霉,这说明黍米的营养在固体培养条件下能被该菌有效吸收和利用。

综上所述,用黍米固体法直接培养虫霉而获得生物学性状类似于天然病死虫尸的人工培养物,是虫霉培养技术的显著进步,必将在害虫的虫霉流行病研究与利用方面产生积极影响。

致谢 本实验室华丽、陈春、应盛华、徐均焕对本项研究给予技术上的支持及配合,谨表谢忱。本工作为国家自然科学基金(批准号:30070514)、教育部长江学者奖励计划 and 高校博士点学科专项基金(批准号:200203335041)资助项目。

参 考 文 献

1 李增智. 中国真菌志, 第 13 卷, 虫霉目. 北京: 科学出版社, 2000. 1~168

2 Feng M G. Microbial control of insect pests with entomopathogenic fungi in China: A decade's progress in research and utilization. In: Upadhyay R K, ed. Advances in microbial control of insect pests. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002. 213~234

3 冯明光. 虫霉流行病及其对害虫种群的自然控制与利用. 中国虫生真菌研究与应用, 第 4 卷. 北京: 中国农业科技出版社, 1997. 6~17

4 Humber R A. Synopsis of a revised classification for the Entomophthorales (Zygomycotina). Mycotaxon, 1989, 34: 441~460

5 Feng M G, Johnson J B, Halbert S E. Natural control of cereal aphids (Homoptera: Aphididae) by entomopathogenic fungi (Zygomycetes: Entomophthorales) and parasitoids (Hymenoptera: Braconidae and Encyrtidae) on irrigated spring wheat in southwestern Idaho. Environ Entomol, 1991, 20: 1699~1710

6 Feng M G, Nowierski R M, Johnson J B, et al. Epizootics caused by entomophthoralean fungi (Zygomycetes, Entomophthorales) in populations of cereal aphids (Hom, Aphididae) in irrigated small grains of southwestern Idaho, USA. J Appl Entomol, 1992, 113: 376~390

7 Pickering J, Dutcher D, Ekblom B S. An epizootic caused by *Erynia neoaphidis* and *E. radicans* (Zygomycetes, Entomophthorales) on *Acyrthosiphon pisum* (Hom, Aphididae) on legumes under overhead irrigation. J Appl Entomol, 1989, 107: 331~333

8 Wilding N, Perry J N. Studies on *Entomophthora* in populations of *Aphis fabae* on field beans. Ann Appl Biol, 1980, 94: 367~378

9 Wraight S G, Wraight S P, Carruthers R I, et al. Description of a *Zoophthora radicans* (Zygomycetes: Entomophthorales) epizootic in a population of *Empoasca kraemeri* (Homoptera: Cicadellidae) on beans in central Brazil. J Invertebr Pathol, 1991, 58: 311~326

10 Milner R J, Soper R S, Lutton G G. Field release of an Israeli strain of the fungus *Zoophthora radicans* for biological control of *Therioaphis trifolii* f. *maculata*. J Aust Entomol Soc, 1982, 21: 113~118

11 Wilding N, Mardell S K, Brobyn P J. Introducing *Erynia neoaphidis* into a field population of *Aphis fabae*: Form of the inoculum and effect of irrigation. Ann Appl Biol, 1986, 108: 373~385

12 Wilding N, Mardell S K, Brobyn P J, et al. The effect of introducing the aphid-pathogenic fungus *Erynia neoaphidis* into populations of cereal aphids. Ann Appl Biol, 1990, 117: 683~691

13 Latteur G, Godefroid J. Trial of field treatment against cereal aphids with mycelium of *Erynia neoaphidis* (Entomophthorales) produced *in vitro*. In: Cavalloro R, ed. Aphid antagonists. Rotterdam: A.A. Balkema, 1983. 2~10

14 Latteur G, Destain J, Godefroid J. Research on the feasibility of producing *in vitro* an entomophthorale biopreparation based on conidia or mycelium to control cereal aphids. In: Cavalloro R, Piavaux A, eds. CEC programme on integrated and biological control, Final Report 1979/1983. EUR 8689 B-0752, 1984. 407~416

15 Latge J P, Silvie P, Papierok B, et al. Advantages and disadvantages of *Conidiobolus obscurus* and *Erynia neoaphidis* in the biological control of aphids. In: Cavalloro R, ed. Aphid antagonists. Rotterdam: A.A. Balkema, 1983. 20~32

16 Shah P A, Aebi M, Tuor U. Method to immobilize the aphid-pathogenic fungus *Erynia neoaphidis* in an alginate matrix for biocontrol. Appl Environ Microbiol, 1998, 64: 4260~4263

17 Shah PA, Aebi M, Tuor U. Production factors involved in the formulation of *Erynia neoaphidis* as alginate granules. Biocontrol Sci Technol, 1999, 9: 19~28

18 刘志强, 冯明光, 徐均焕. 飞虱虫疔霉液培菌丝的凝胶化及其杀蚜活性. 菌物系统, 2001, 20(3): 353~357

19 Feng M G, Xu Q. A simple method for routine maintenance and preservation of entomophthoraceous cultures. J Invertebr Pathol, 2001, 77: 141~143

20 刘志强, 冯明光. 适合飞虱虫疔霉菌丝生产的液体培养基组分及发酵条件. 生物工程学报, 2001, 17(4): 463~466

21 许谦, 冯明光. 植物油对虫霉菌液体培养与保存的作用. 菌物系统, 2001, 20(1): 79~86

22 Xu J H, Feng M G. The time-dose-mortality modeling and virulence indices for the two entomophthoralean species, *Pandora delphacis* and *P. neoaphidis*, against the green peach aphid, *Myzus persicae*. Biol Contr, 2000, 17: 29~34

23 Xu J H, Feng M G, Xu Q. The virulence of the entomophthoralean fungus *Pandora delphacis* to the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. Entomol Sin, 1999, 6(3): 233~241

24 应盛华, 冯明光. 球孢白僵菌分生孢子乳悬剂的配方筛选. 植物保护学报, 2001, 28(4): 345~351

25 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统. 北京: 科学出版社, 2002, 1~648

26 Latgé J P. Comparaison des exigences nutritionnelles des entomophthorales. Ann Microbiol (Inst Pasteur), 1981, 132B: 299~306

27 Latgé J P, de Bièvre C. Influences des liquides et acides gras jaune d'oeuf sur la croissance et la sporulation des entomophthorales. Ann Microbiol (Inst Pasteur), 1976, 127A: 261~274

28 Latgé J P, Remaudière G, Papierok B. Un nouveau milieu pour la croissance et la sporulation d'Entomophthorales pathogens d'aphids. Ann Microbiol (Inst Pasteur), 1978, 129B: 463~476

29 Wilding N and Latteur G. The entomophthorales-problems relative to their mass production and their utilization. Med Fac Landbouww Rijksuniv Gent, 1987, 52: 159~164

(2003-02-10 收稿, 2003-04-01 收修改稿)