

一株小阔胫绒金龟幼虫绿僵菌的分离 鉴定及培养条件的优化研究*

刘思雨^{1**} 薛锐^{1**} 肖关丽^{2***} 李正跃¹ 陈斌^{1***}

(1. 云南农业大学植物保护学院, 云南生物资源保护与利用国家重点实验室, 昆明 650201;

2. 云南农业大学农学与生物技术学院, 昆明 650201)

摘要 【目的】为了弄清从云南省昆明市寻甸县大河桥农场田间自然罹病的小阔胫绒金龟 *Maladera ovatula* (Fairmaire) 幼虫僵虫上分离纯化获得的 1 株绿僵菌 *Metarhizium* sp. (编号 MAXD170705) 的种类及其培养条件, 为蛴螬生防制剂开发提供依据。【方法】室内通过菌株的分离与纯化, 并根据形态特征及 ITS-5.8S DNA 基因序列, 对该菌株种类进行鉴定, 同时采用正交旋转组合试验设计, 测定该菌株在不同培养基上于不同温度、光照、pH 值条件下的菌落生长速度及产孢特性。【结果】经形态学与分子鉴定, 确定菌株 MAXD170705 为金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae*, 该金龟子绿僵菌 MAXD170705 菌株在 SMAY、PDA 和 SDAY 3 种培养基上均能生长, 但在 SDAY 培养基上孢子萌发率以及菌落生长、产孢时间与产孢量均优于其他 2 种培养基。在 (25±1) °C、16 L:8 D 和 pH=7.0 条件下 MAXD170705 菌株生长最快, 菌落直径日增量为 0.38 cm/d; 菌落直径最大, 第 8 天达 2.73 cm; 产孢时间最早, 从第 3 天开始产孢, 并且产孢量最高, 达 6.68×10^6 孢子/cm²。【结论】营养成分对菌株发育过程中具有重要作用, 只有丰富而且恰当的营养条件才有利于不同来源的绿僵菌菌丝生长以及产孢。除此之外, 外界环境条件也是影响其生长发育的重要因素。综合以上结果, 利用 pH=7.0 的 SDAY 培养基, 于 25 °C、光照 16 L:8 D 为金龟子绿僵菌 MAXD170705 的最适培养条件。

关键词 金龟子绿僵菌; 小阔胫绒金龟; 正交设计; 培养条件; 菌落生长; 产孢

Use of an orthogonal rotation combination design to identify optimal culture conditions for a *Metarhizium* sp. isolated from *Maladera ovatula* (Fairmaire) larvae

LIU Si-Yu^{1**} XUE Rui^{1**} XIAO Guan-Li^{2***} LI Zheng-Yue¹ CHEN Bin^{1***}

(1. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan, College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract 【Objectives】To determine the optimal culture condition for a strain of *Metarhizium* sp. (MAXD170705) isolated from muscardine-infected cadavers of *Maladera ovatula* (Fairmaire) larvae from Daheqiao farm, Xundian county, Kunming city, Yunnan province. 【Methods】The fungal strain MAXD170705 was identified based on morphological and culturing characteristics and its ITS-5.8S gene sequence. Optimal culture conditions for the growth and sporulation of this strain, including culture medium, temperature, light and pH, were determined based on an orthogonal rotational combined design. 【Results】The MAXD170705 strain was *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin. This strain can be cultured on either SMAY, PDA or SDAY medium, but cumulative germination, growth rate, sporulation time and spore quantity were best on SDAY medium. Optimal culture conditions were a pH of 7.0, 25 °C and a photoperiod of 16 h light and 8 h

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目 (31660537, 31760519); 国家重点研发计划项目 (2018YFD0200703)

**共同第一作者 Co-first authors, E-mail: 779350009@qq.com; 1670442079@qq.com

***共同通讯作者 Co-corresponding authors, E-mail: chbins@163.com; glxiao9@163.com

收稿日期 Received: 2018-08-23; 接受日期 Accepted: 2018-12-18

darkness. Cumulative germination was 100.00% by Day 4, the colony growth rate was 0.38 cm/d and the diameter was 2.73 cm. The colony began to sporulate on the day 3 and sporulation was 6.68×10^6 spore/cm². [Conclusion] Nutrients played an important role in the development of this strain. Optimal mycelium growth and sporulation of *Metarhizium* sp. obtained from different sources was only achieved when nutrients were abundant and appropriate. In addition, external environmental conditions were important factors affecting colony growth and development. Of the media evaluated, the SDAY medium was the best for the growth and sporulation of the MAXD170705 strain of *M. anisopliae*. Optimal culture conditions were a pH of 7.0, 25 °C and a photoperiod of 16 L : 8 D.

Key words *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin; *Maladera ovatula* (Fairmaire); orthogonal design; culture condition; colony growth; sporulation

蛴螬是鞘翅目金龟总科 (Scarabaeoidea) 幼虫的总称, 因其生活在地下, 危害具有较强的隐蔽性, 而且这类害虫食性杂、食量大、分布广、种类多, 防治困难 (胡琼波, 2004; 秦雪峰等, 2007; 张美翠等, 2014)。长期以来, 对蛴螬的防治主要依靠化学农药, 但农药残留和污染环境, 同时由于长期施用单一农药, 蛴螬对多种农药已产生相应抗性 (张芝利, 1984; 刘树森等, 2008)。由此, 利用微生物防治蛴螬是绿色植保及生态农业发展的重要途径 (林华峰等, 2006)。

绿僵菌属 *Metarhizium* spp. 是昆虫病原真菌的主要类群之一, 其寄主范围广, 致病力强, 对人、畜、作物无毒害, 易在害虫种群间自然流行以及对环境友好, 是长期以来害虫综合防治措施研究和筛选中的重要内容 (蒲蛰龙和李增智, 1996)。绿僵菌种类丰富, 由于其存在一定的寄主专化性, 不同地理来源、不同寄主来源的绿僵菌菌株在菌落形态及生长速率、产孢等生物学特性以及致病力等方面都存在很大差异 (陈祝安和黄基荣, 1997; 苏宇等, 2010), 采集分离和筛选适宜于当地害虫生物防治的绿僵菌菌株显得十分必要。一种真菌的菌落特征主要受培养基的营养成分、培养温度、pH 值、光照条件、接种量等条件的影响 (孙家宝等, 2007; 杜开书等, 2008; Ansari *et al.*, 2009; 苏宇等, 2010), 且只有在适宜的环境下才更容易浸染寄主昆虫 (Thomas *et al.*, 1987; Bartlett and Jaronski, 1988; Issaly *et al.*, 2005; 李佳颖等, 2013)。因此, 开展生防菌株生物学特性研究, 系统掌握其生物学特性, 对优化其生长发育和宿存的营养与

环境条件而达到更好地利用真菌具有重要意义。本研究利用从云南省昆明市寻甸县大河桥农场农田采集的自然罹病蛴螬上分离获得的绿僵菌, 进行种类鉴定, 同时采用正交旋转组合设计方法, 筛选优化其培养条件, 以期为蛴螬生物防治绿僵菌制剂研发提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

从云南省昆明市寻甸县大河桥农场 (N 25°31'8", E 103°16'46", 海拔 1 840 m) 三角槭树 *Acer buergerianum* Miq 下采集到罹病小阔胫码绢金龟 *Maladera ovatula* (Fairmaire) 幼虫僵虫, 在室内用 PDA 培养基进行分离培养, 并编号为 MAXD170705。

1.2 供试培养基

马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基、萨氏葡萄糖琼脂酵母浸膏 (SDAY) 培养基、萨氏麦芽糖琼脂酵母浸膏 (SMAY) 培养基 (蒲蛰龙和李增智, 1996)。

1.3 试验方法

1.3.1 分离纯化 采用 SDAY 培养基在无菌条件下轻轻蘸取感病蛴螬上的成熟分生孢子粉, 采用点接法将分生孢子接于培养基 (90 mm) 中央, 倒置放于 (25±1) °C、黑暗条件下培养。定期观察菌落形态及颜色。待目标菌落长出菌丝时, 挑去少量菌丝进行再次分离纯化, 以期分离出单一菌种。待纯化后采用平板划线法进行接种培养,

最终置于 4℃ 冰箱中保存。

1.3.2 培养性状及形态鉴定 挑取纯化后的 MAXD170705 菌株成熟分生孢子, 接于 SDAY 培养基中央, 倒置放于 25℃、黑暗条件下培养, 重复 5 次。每天观察菌落形态及颜色。待菌落长至 3-4 d 时, 小心挑取菌丝于载玻片上, 滴加 20 μL 0.05% 吐温-80 水溶液, 慢慢盖上盖玻片, 置于垫有三层湿润滤纸的培养皿中, 用封口膜密封后置于 25℃ 恒温培养。在显微镜下定期观察菌落生长情况。培养第 8 天后待产生大量分生孢子时, 挑取上述菌落中央的分生孢子制作玻片, 在显微镜下观察其分生孢子的形状并测量其大小。

1.3.3 菌株的分子鉴定 用无菌枪头刮取少量经 SDAY 培养基活化后的菌体置于无菌研钵中, 用液氮快速研磨成粉末状, 加入到 1.5 mL 的离心管中。DNA 提取的后续步骤参考真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒 (生工生物工程 (上海) 有限公司)。提取的 DNA 用分光光度计测量其浓度, $DO_{260}/OD_{280}=1.72$, 并进行 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳, 之后保存于 -20℃。然后采用 ITS 通用引物进行 PCR 扩增反应。

引物由昆明硕擎生物科技有限公司合成。以提取的绿僵菌 DNA 为模板进行 ITS-PCR 扩增反应, 反应体系 (25 μL): 12.5 μL 2xPCRMix (北京康为世纪生物科技有限公司), 1 μL ITS1, 1 μL ITS2, 1 μL 模板 DNA, 9.5 μL ddH₂O。PCR 扩

增程序: 94℃ 预变性 4 min, 94℃ 变性 1 min, 57℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1.5 min, 共 35 个循环; 72℃ 延伸 8 min; 4℃ 保存。PCR 产物采用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 记录凝胶成像结果。并对 ITS-PCR 扩增产物进行测序, 由昆明硕擎生物科技有限公司测序。

根据测序结果, 去除两端质量不好的序列, 提交到 NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 运用 Blast 查找相似性最高的典型菌株并下载序列。运用 MEGA7.0.26 软件, 采用国际通用的邻接法 (Neighbour-Joining) 和 Kimura 双参数校正模型构建系统发育树。重复取样 1 000 次进行自展值 (Bootstrap value) 分析来评估系统进化树的拓扑结构的稳定性。

1.3.4 菌株培养条件的筛选优化 试验根据正交旋转组合设计, 设 4 个因素, 分别为 A: 培养基 (萨氏葡萄糖琼脂酵母浸膏 (SDAY) 培养基、马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基和萨氏麦芽糖琼脂酵母浸膏 (SMAY) 培养基); B: 温度 (20、25、30℃); C: 光照条件 (L:D=24:0、L:D=16:8、L:D=12:12) (杨腊英等, 2008; 侯颖等, 2015); D: pH (pH=6.0、pH=7.0、pH=8.0) (宋漳, 2002; 殷幼平等, 2010) 因素, 每因素 3 个水平设计正交试验, 研究绿僵菌 MAXD170705 菌株最适培养条件。正交设计表见表 1。

表 1 菌株培养条件 L9 (3⁴) 正交设计表
Table 1 Design and results of L9 (3⁴) orthogonal test of strain culture condition

处理 Treatment	A (培养基) Culture mediums	B (温度) Temperature	C (光照) Photoperiods	D (pH) pH	水平组合 Level combinations
1	1	1	1	1	A1B1C1D1
2	1	2	2	2	A1B2C2D2
3	1	3	3	3	A1B3C3D3
4	2	1	2	3	A2B1C2D3
5	2	2	3	1	A2B2C3D1
6	2	3	1	2	A2B3C1D2
7	3	1	3	2	A3B1C3D2
8	3	2	1	3	A3B2C1D3
9	3	3	2	1	A3B3C2D1

共设 9 个处理,分别为:处理 1:采用 pH=6.0 的 SDAY 培养基,于 20℃,光照 L:D=24:0 环境条件下培养;处理 2:采用 pH=7.0 的 SDAY 培养基,于 25℃,光照 L:D=16:8 环境条件下培养;处理 3:采用 pH=8.0 的 SDAY 培养基,于 30℃,光照 L:D=12:12 环境条件下培养;处理 4:采用 pH=8.0 的 PDA 培养基,于 20℃,光照 L:D=16:8 环境条件下培养;处理 5:采用 pH=6.0 的 PDA 培养基,于 25℃,光照 L:D=12:12 环境条件下培养;处理 6:采用 pH=7.0 的 PDA 培养基,于 30℃,光照 L:D=24:0 环境条件下培养;处理 7:采用 pH=7.0 的 SMAY 培养基,于 20℃,光照 L:D=12:12 环境条件下培养;处理 8:采用 pH=8.0 的 SMAY 培养基,于 25℃,光照 L:D=24:0 环境条件下培养;处理 9:采用 pH=6.0 的 SMAY 培养基,于 30℃,光照 L:D=16:8 环境条件下培养。

1.3.4.1 菌落生长速度 菌株生长量测定主要采用点植法,分别将成熟的分生孢子接种于不同培养基(90 mm)中央,置于相应培养条件下培养。每天观察菌落的生长,记载各培养条件下的初始产孢时间、色泽、形态等情况。从第 4 天开始采用十字交叉法测量菌落横纵直径,待产孢结束后测定菌落产孢量。每个处理重复 3 次。

1.3.4.2 产孢量 用灭菌后的打孔器(直径=1.2 cm)从每一菌落的中心点至边缘距离的 1/2 处打孔,将截取的小菌块置于含有 20 mL 0.05% 吐温-80 无菌水的三角瓶中,磁力搅拌 10 min,打散孢子团,获孢子悬浮液。用微量移取器吸取混匀的孢子悬浮液,用血球计数板计数,以 10 倍进行稀释至血球计数板可数为止,计算每种培养基上单个菌落的平均产孢量(侯颖等,2015)。

1.3.4.3 孢子萌发率 采用微室萌发法测定孢子萌发率(陈祝安和潘玲聪,1995),即先将收集到的孢子粉置于盛有 100 mL,0.01%Tween-80 无菌水的锥形瓶中,制成相应孢子悬浮液。将孢子悬浮液滴入凹玻片中,盖上无菌盖玻片,制成萌发微室。随后将其放入垫有 3 层湿润滤纸的培养皿中,置于相应培养条件下培养,每隔 8 h 后观察分生孢子萌发情况。每个处理重复 3 次,每

次随机观察 300 个孢子记录萌发个数,统计孢子萌发率。

1.4 数据处理及统计分析方法

菌落直径=(菌落横径+菌落纵径)/2;

菌落直径日增长量(cm/d)=平均菌落直径/培养天数;

每 cm² 菌落含孢量=平均每小格孢子数×400×10⁴×稀释倍数/打孔器面积;

每 mL 孢子总量=80 小格内孢子总数/80×400×10⁴×稀释倍数;

孢子萌发率(%)=萌发的孢子数/观察孢子总数×100。

试验数据利用 SPSS 20.0 软件进行处理、分析。

2 结果与分析

2.1 菌株种类鉴定

2.1.1 蛱螭感染 MAXD170705 菌株后的症状

在采集地发现的罹病蛱螭整个虫体僵硬,整个虫体布满白色至橄榄色絮状菌丝。室内进行保湿培养后 2-3 d 虫体上开始产生白色分生孢子,随后 1-2 d 随着分生孢子成熟,变成橄榄色分生孢子堆,最终整个虫体通体变绿,虫体周围还有一些分散型的菌丝(图 1)。

2.1.2 菌株形态观察及鉴定 菌株 MAXD170705 在 SDAY 培养基上,菌落生长初期呈白色短绒状,3 d 后菌落中央开始呈现浅绿色分生孢子堆,菌落边缘规则圆滑,菌丝向四周放射状平铺生长。随着培养时间的增长,菌落逐渐扩大,绿色面积变大,颜色不断加深至深绿色,呈环形堆积状向四周扩散,周围有分散型的菌丝。菌落背面颜色呈黄棕色(图 2)。

2.1.3 菌株分生孢子形态特征 菌株 MAXD170705 的菌丝具分枝和分隔,无色光滑,宽 1.5-1.9 μm;分生孢子单孢串连,大多圆柱状或卵形,中部常稍窄,两端钝圆,(8.0-12.4) μm×(3.6-4.4) μm。根据蒲蛰龙和李增智(1996)描述的菌落、产孢结构和分生孢子等形态特征上,该菌株与其中描述的金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin 相吻合(图 3)。

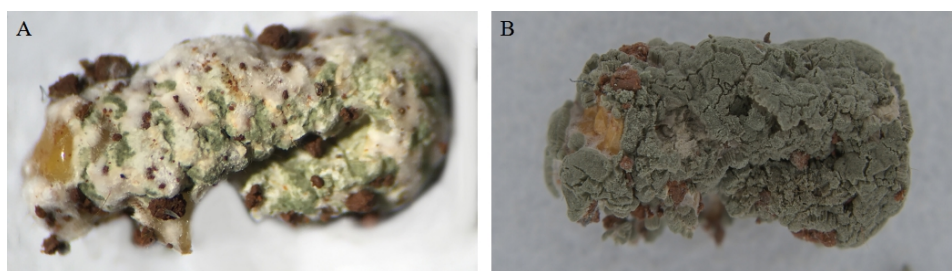


图 1 被菌株 MAXD170705 感染的小阔胫码绢金龟幼虫

Fig. 1 The larva of *Maladera ovatula* infected by strain MAXD170705

A. 被菌株 MAXD170705 感染小阔胫码绢金龟幼虫初期形态；B. 被菌株 MAXD170705 感染小阔胫码绢金龟幼虫后期形态。

A. The morphological characteristics of MAXD170705 strain infected larva of *M. ovatula* in early days; B. The morphological characteristics of MAXD170705 strain infected larva of *M. ovatula* in later period.

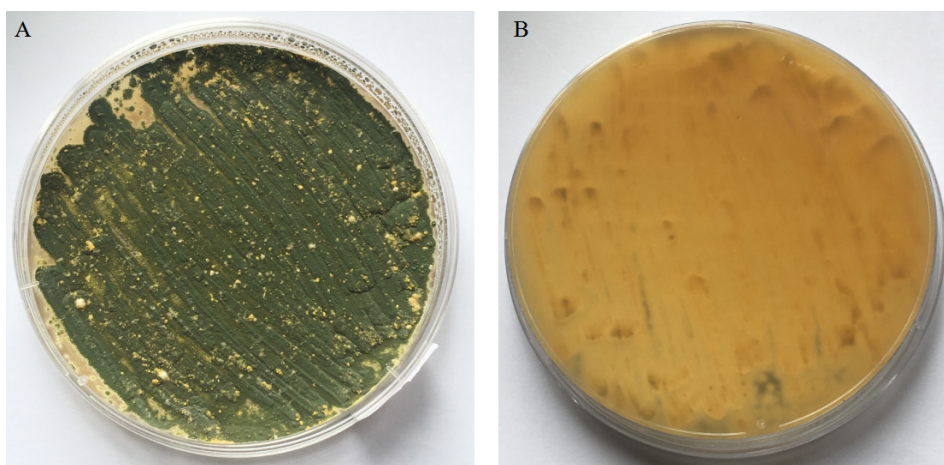


图 2 菌株的菌落形态

Fig. 2 The colony morphology of the strain

A. 菌株 MAXD170705d 在 SDAY 培养基正面形态；B. 菌株 MAXD170705 在 SDAY 培养基背面形态。

A. The colony morphology on right side of SDAY medium of MAXD170705 strain inoculated;

B. The colony morphology on reverse side of SDAY medium of MAXD170705 strain inoculated.

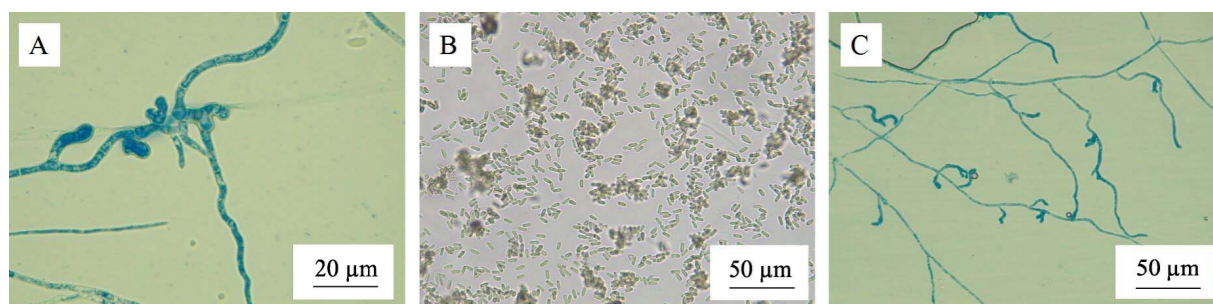


图 3 菌株 MAXD170705 的形态特征

Fig. 3 The morphological feature of the strain MAXD170705

A. 菌株 MAXD170705 菌丝形态；B. 菌株 MAXD170705 孢子形态；C. 菌株 MAXD170705 产孢小梗。

A. Mycelium morphology of MAXD170705 strain; B. Spore morphology of MAXD170705 strain;

C. Conidiophore of MAXD170705 strain.

2.1.4 系统发育分析 经测序后，获得一段 532 bp 长的片段。利用 GENBANK 对测序结果进行

blast 同源性比对，结果表明，该菌株的序列与数据库中序列号 JN133852.1 的金龟子绿僵菌

Metarhizium anisopliae strain LD421 菌株的相似性达到 100%, 与其他金龟子绿僵菌 *M. anisopliae* 的同源性也都在 99% 以上。

利用 MEGA7.0.26 构建系统发育进化树, 可以看出该菌株以较高的自展值与数据库中其他金龟子绿僵菌聚为一支。说明该菌株与金龟子绿僵菌的同源性较高。结合其形态特征、该菌株 ITS 序列与数据库中的相似性以及基于 ITS 序列的同源性分析, 最终将该菌鉴定为金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin, 编号为 MAXD170705 (图 4)。

2.2 不同培养条件下金龟子绿僵菌 MAXD170705 的菌落生长速度

结果(图 5)表明, 金龟子绿僵菌 MAXD170705 菌株在供试的培养条件下均可以生长, 但是彼此间存在一定的差异。菌落在 25-30 条件下的生长量高于 20-25 条件下; 在不同的培养基上,

菌落生长量也存在一定的差异, 主要表现为 SDAY > SMAY > PDA。在 SDAY 培养基上, 于 pH=7.0、25 和 16 L : 8 D 条件下菌株生长最快, 直径日增量为 0.38 cm/d, 其次是 SMAY 培养基, pH=8.0、25 和 24 L : 0 D 条件下平均直径日增量为 0.34 cm/d。该菌株在上述 2 种培养条件下生长较为稳定, 前 3 d 生长量差异不显著, 随后从第 4 天开始, 两者生长量差异显著, 直到第 8 天, 生长量间无明显差异, 菌落直径分别达到 2.73 cm 和 2.61 cm。该菌株在其他培养条件下菌落生长变化较大, 直到第 8 天, 菌株在 30 条件下, 利用 pH=8.0 的 SDAY 培养基, 于 L : D=12 : 12 培养条件下菌落直径达 2.49 cm; 利用 SMAY 培养基, 于 pH=6.0 和 16 L : 8 D 培养条件下菌落直径达 2.40 cm。整个培养过程中采用 PDA 培养基, 于 30、pH=7.0 和 24 L : 0 D 条件下菌落生长较差, 平均直径日增量为 0.23 cm/d, 第 8 天菌落直径仅有 1.80 cm。

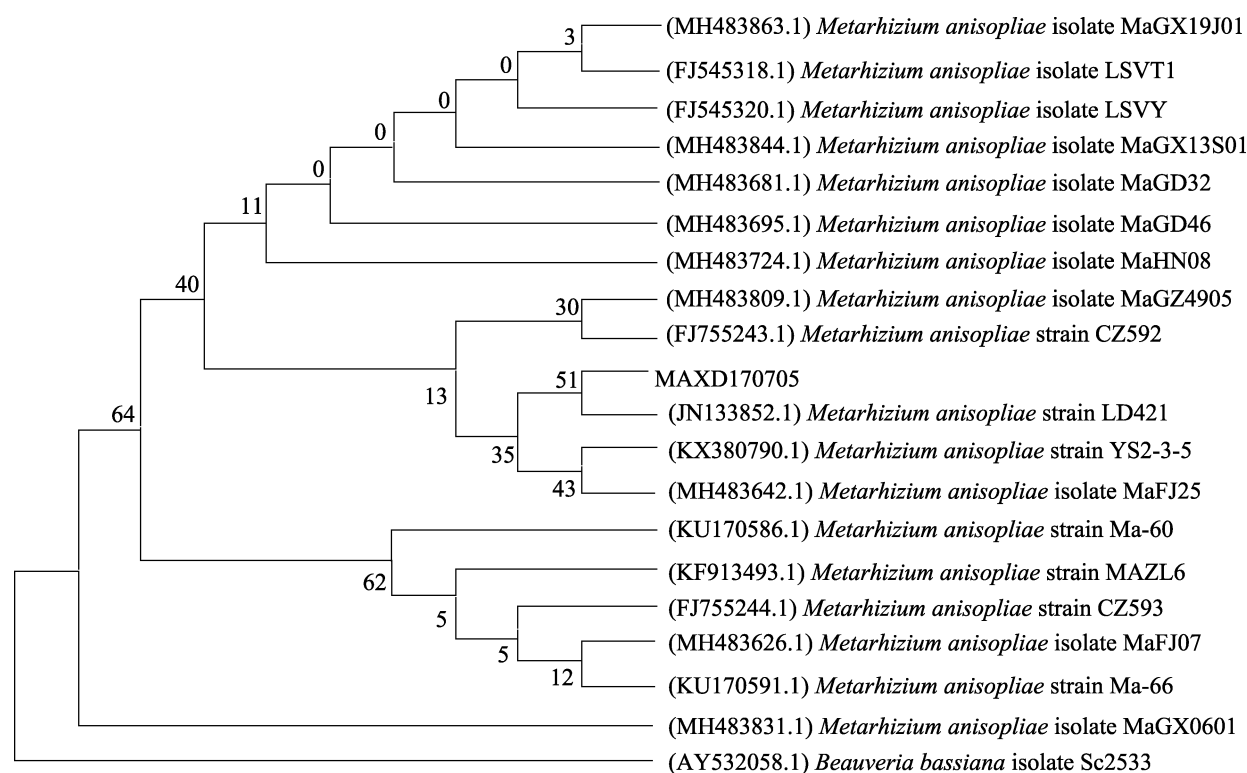


图 4 基于 ITS-5.8S rDNA 序列的绿僵菌的系统发育树 (邻接法 Neighbour-Joining)

Fig. 4 The phylogenetic tree of *Metarhizium* strains based on ITS-5.8S rDNA sequence (Neighbour-Joining)

图中节点上标注的是大于 50% 经 1 000 次比对后所得的检验值, 以球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 为外群。

The numbers above or below the branches are bootstrap values when exceeding 50%.

Gene sequences of *Beauveria bassiana* is used to root the tree.

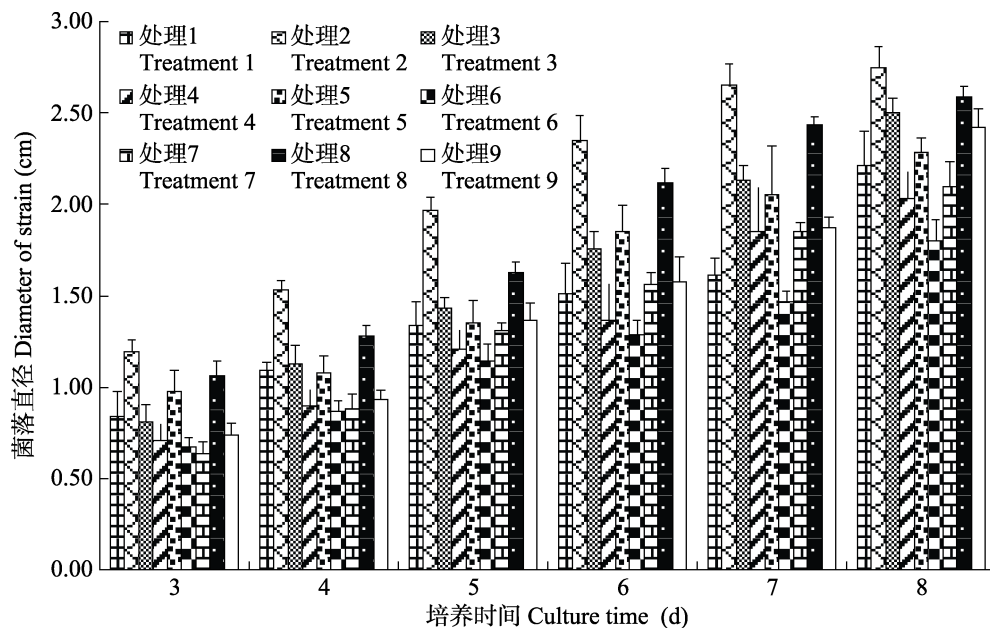


图 5 金龟子绿僵菌 MAXD170705 菌株在不同培养条件下的菌落直径 (cm)

Fig. 5 The colony diameter of MAXD170705 of *Metarhizium anisopliae* under the different culture conditions (cm)

2.3 金龟子绿僵菌 MAXD170705 在不同培养条件下的产孢量

从不同培养条件下的产孢时序及产孢量来看 (表 2), 该金龟子绿僵菌 MAXD170705 菌株

在不同培养条件下均能产孢, 其中处理 2, 即在 pH=7.0 的 SDAY 培养基上于 25℃, 光照条件 L:D=16:8 环境下最先产孢, 第 3 天就开始产孢, 并且产孢量最高, 达 6.68×10^6 孢子/cm²,

表 2 金龟子绿僵菌 MAXD170705 菌株在不同培养条件下的生长情况

Table 2 Growth of MAXD170705 of *Metarhizium anisopliae* under the different culture conditions

处理 Treatments	菌落直径日增量 (cm/d) The daily increase of the colony diameter (cm/d)	初始产孢时间 (d) The first sporulation day (d)	产孢量 ($\times 10^6$ 孢子/cm ²) The sporulation ($\times 10^6$ spores/cm ²)
处理 1 Treatment 1	0.26±0.02 deCDE	4	2.72±0.23 cC
处理 2 Treatment 2	0.38±0.02 aA	3	6.68±0.12 aA
处理 3 Treatment 3	0.29±0.02 cC	5	1.18±0.11 fE
处理 4 Treatment 4	0.24±0.02 eFE	4	2.02±0.11 eD
处理 5 Treatment 5	0.29±0.02 cC	4	2.26±0.28 deD
处理 6 Treatment 6	0.23±0.03 fE	6	0.94±0.09 fEF
处理 7 Treatment 7	0.25±0.02 efDE	4	2.40±0.17 dCD
处理 8 Treatment 8	0.34±0.02 bB	4	6.07±0.29 bB
处理 9 Treatment 9	0.28±0.03 cdCD	5	0.56±0.07 gF
	$F=27.00, P<0.01$		$F=440.89, P<0.01$

表中数据为平均数±标准误, 同列数据后标有小写字母表示差异达 5% 显著水平 (Duncan's 新复极差法), 标有不同大写字母表示差异达 1% 显著水平。下表同。

Data are mean ± standard error, and followed by different lowercase letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level by Duncan's new multiple range, while followed by the different uppercase letters indicate significant difference at 0.01 level. The same below.

极显著高于其他条件下的产孢量,其次为处理 1, 4, 5, 7, 8 下的产孢时序,均从第 4 天开始产孢,其中处理 8 即利用 pH=8.0 的 SMAY 培养基,于 25℃,光照 L:D=24:0 环境条件下培养时产孢量最高,达 6.07×10^6 孢子/cm²,也极显著高于其他条件下的产孢量。而在 20℃条件下,利用 pH=6.0 的 SDAY 培养基,置于光照 L:D=24:0 环境条件下培养和利用 pH=7.0 的 SMAY 培养基,置于 L:D=12:12 环境下培养后的产孢量分别为 2.72×10^6 孢子/cm² 和 2.40×10^6 孢子/cm²,也显著高于其他处理。而利用 PDA 培养基,在 pH=6.0、25℃、L:D=12:12 条件下高于 pH=8.0、20℃、L:D=16:8 条件。相比而言,该菌株在 30℃下的产孢量均极显著低于其他处理,最低仅有 5.60×10^5 孢子/cm²。

2.4 不同培养条件下金龟子绿僵菌 MAXD170705 产生的分生孢子的萌发率比较

从表 3 可以看出,不同处理产生的孢子粉中孢子萌发率存在一定的差异,其中处理 2 即采用 pH=7.0 的 SDAY 培养基,于 25℃、L:D=16:8 培养条件以及处理 8 即采用 pH=8.0 的 SMAY 培养基,于 25℃、L:D=24:0 培养条件下收集到的孢子其萌发率分别在第 4 天和第 5 天达到 100.00%,而且在相同的培养时段两者的

萌发率均显著高于其他处理。其次为处理 3 (采用 SDAY 培养基,于 pH=8.0、30℃、L:D=12:12)培养条件下收集的孢子,其第 5 天孢子全部萌发,该处理下的萌发率也显著高于其他处理。相比而言,处理 6 即采用 pH=7.0 的 PDA 培养基,于 30℃,光照 L:D=24:0 环境条件下收集的孢子萌发率较低,但也能达到 84.00%。

3 结论与讨论

绿僵菌作为一种传统的昆虫病原真菌,以其广泛的寄主、较强的致病力和良好的产孢能力及宿存能力,在害虫种群的自然控制中起着重要作用(蒲蛰龙和李增智,1996;陈自宏等,2014)。绿僵菌菌落形态特征常会随着地理环境的不同而表现出明显的差异,因而使传统真菌分类鉴定的形态学特征、生长特性以及生理生化指标在相近种的分类中受到一定限制(宋章永,2009;王刚等,2013;王萌等,2014)。由此,分子生物学技术已成为解决绿僵菌属近缘种的分类疑难的重要手段(张亚波等,2012)。但是单纯依靠 ITS 序列不能区别复合种下形态学相近的物种(林华峰等,2011;王萌等,2014)。由此,形态学分类依然在真菌分类学上占主导地位(缪承杜和洪葵,2007;申剑飞等,2012;于浩海等,

表 3 不同处理下 MAXD170705 菌株的孢子萌发率
Table 3 The conidia germination rate of MAXD170705 of *Metarhizium anisopliae* under different treatments

处理 Treatments	不同时间 (h) 累积萌发率 (%) Cumulative germination rate				
	24	48	72	96	120
处理 1 Treatment 1	30.00±0.01 cCD	47.00±0.05 cC	63.33±0.02 dC	84.67±0.06 cB	95.00±0.06 abAB
处理 2 Treatment 2	48.67±0.02 aA	78.67±0.05 aA	95.67±0.03 aA	100.00±0.00 aA	100.00±0.00 aA
处理 3 Treatment 3	35.67±0.03 bB	68.33±0.02 bB	81.00±0.01 cB	92.33±0.01 bAB	100.00±0.00 aA
处理 4 Treatment 4	22.00±0.02 eFG	34.67±0.03 dD	46.00±0.03 efD	66.33±0.04 eC	86.67±0.04 cdC
处理 5 Treatment 5	26.67±0.02 dDE	36.67±0.03 dD	48.33±0.08 eD	72.33±0.03 dC	90.67±0.02 bcBC
处理 6 Treatment 6	18.33±0.01 fG	31.67±0.02 dD	42.00±0.02 fD	65.33±0.05 eC	84.00±0.04 dC
处理 7 Treatment 7	24.00±0.03 deEF	35.33±0.03 dD	50.00±0.03 eD	73.67±0.01 dC	90.33±0.04 bcBC
处理 8 Treatment 8	45.67±0.02 aA	73.00±0.04 abAB	88.33±0.03 bAB	99.67±0.01 aA	100.00±0.00 aA
处理 9 Treatment 9	32.00±0.02 cBC	49.33±0.05 cC	66.33±0.06 dC	88.33±0.05 bcB	96.00±0.04 abAB

2014)。本研究采用光学鉴定与分子鉴定相结合,形态特征鉴定方面,从培养性状、光学显微的形态特征相结合分析,初步确定了其形态特征;进而通过基因序列分析,进一步明确了该菌株的分类地位,确定为金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae*,也使得鉴定结果更为科学和准确。

不同地理及寄主来源的绿僵菌在营养需求以及生物学特性等方面也存在明显差异。本研究中的金龟子绿僵菌 MAXD170705 在 SDAY、PDA 和 SMAY 3 种培养基上均能生长与产孢,其中在 SDAY 上其产孢时间、生长速率、产孢量等均处于最优状态,其次为 SMAY 培养基。相比而言,菌落在 PDA 培养基上,就其相同评价指标均处于最低。李树一等(2007)研究发现金龟子绿僵菌 LA 菌株在 SMAY 培养基上生长最快,而 LD 菌株在 PPDA 培养基上生长较快,但 2 个菌株均在 SMAY 上的产孢量最高。严智燕等(2011)研究发现金龟子绿僵菌 Ma10 在 SDAY 培养基上生长最快(16 d 时其菌落直径达 6.65 cm),但其产孢量则是在察氏培养基上最高(达 4.49×10^6 孢子/ mm^2)。张建伟等(2012)发现金龟子绿僵菌 CQM125 在 SDAY 培养基上菌落生长最快,14 d 菌落直径达 35.0 mm,但其在 PPDA 培养基上产孢量最高,而 SDAY 和 SMAY 培养基均不适于其产孢。本研究分离自罹病蛴蛄的金龟子绿僵菌 MAXD170705 在 SDAY 培养基上菌落生长速度达 0.38 cm/d,产孢量达 6.68×10^6 孢子/ cm^2 ,其菌落日增量低于李树一等(2007)分离自自然罹病蝗虫上的 2 株金龟子绿僵菌 LA 与 LD;也低于严智燕等(2011)发现的分离自罹病蛴蛄的金龟子绿僵菌 Ma10。但其生长速度高于张建伟等(2012)分离得到的金龟子绿僵菌 CQM125 在 SDAY 培养基上的生长;也高于陈自宏等(2014)研究的金龟子绿僵菌 MAX-2 在 PDA 培养基上的生长速度。究其原因可能是由于寄主来源及地理差异造成的,绿僵菌不同菌株具有一定的地理特异性及寄主专化性,导致不同地理环境、不同寄主来源的绿僵菌菌株在营养需求等方面存在明显差异(孙家宝等,2007;Ansari et al., 2009;苏宇等,2010),由此表明营养成分在菌

株发育过程中具有重要作用,只有丰富而且恰当的营养条件才有利于菌丝生长以及大量产孢。因此,筛选出适合菌株生长繁殖的营养条件,才是害虫生物防治优良绿僵菌菌株筛选及开展的前提工作。

除营养条件外,温度、光照及酸碱性等环境条件也是影响绿僵菌培养过程中生长发育的重要因素(杜开书等,2008;杨腊英等,2008)。卢忠燕等(2004)发现金龟子绿僵菌 WZW₃ 在 pH=7 的 PDA 培养基上于 (27±1) 培养条件下菌落直径及产孢量均最高。林华峰等(2006)室内测定了金龟子绿僵菌大孢变种最适宜温度为 25℃。李树一等(2007)研究发现金龟子绿僵菌 LA 菌株和 LD 菌株分别在 30℃ 和 25℃ 下生长较快,但 2 菌株均在 25℃ 下产孢量较高。张建伟等(2012)发现金龟子绿僵菌 CQM125 菌株培养在 pH=6 的 PPDA 上,置于 30℃、前 6 d 黑暗,后 8 d 光照的环境下产孢量最高。蔡守平等(2012)研究发现金龟子绿僵菌 MaYTTR04 在 PPDA 培养基上于 25℃ 下生长最快。于永浩等(2014)研究发现金龟子绿僵菌 JC002 在 pH=7 的 PDA 培养基上于 25℃ 条件下生长与产孢最好。侯颖等(2015)发现金龟子绿僵菌 Ma121 在察氏琼脂培养基 Czapek 上于 25-30℃、L:D=0:24、pH=7 的培养条件下生长和产孢最好。本研究发现,从云南寻甸县采集和分离的金龟子绿僵菌 MAXD170705 菌株在 25-30℃ 条件下菌落生长较快,但在 20-25℃ 条件下产孢量较高。其中在 25℃、L:D=16:8 环境下,利用 pH=7.0 的 SDAY 培养基培养,菌株生长最快(直径日增量 0.38 cm/d),初始产孢时间最短(第 3 天开始产孢),产孢量最高(6.68×10^6 孢子/ cm^2)。其次是采用 pH=8.0 的 SMAY 培养基,于 25℃,光照条件 L:D=24:0 环境下培养。相比而言,PDA 培养基即便在最适温度、光照、pH 条件下该菌株的生长与产孢均不理想。究其原因可能与地理来源及寄主来源有关,本试验从正交试验中就其不同的培养环境,相对筛选出不同的温度、光照和 pH 组合的最佳培养条件,使得所在培养过程中各个环境因子的作用均得

到了综合表现。因此,还应综合研究其他环境因素的互作效应,筛选出适合菌株生长繁殖的条件,才能获得害虫生防优良金龟子绿僵菌菌株筛选及培养的最优条件。

绿僵菌作为一种高效、低毒、安全的昆虫病原真菌,在多种害虫防治上具有广阔的前景(Alves *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2010; Song and Feng, 2011)。本研究中发现的金龟子绿僵菌 MAXD170705 是一株云南本地蛴螬上分离获得的昆虫病原真菌,在田间对蛴螬的感染作用明显,在蛴螬生物绿僵菌制剂开发中具的良好的潜力。而本研究仅对其生物学特性进行了系统研究,而该菌株对蛴螬的致病力还未进行测定。因此,为系统研究该黄绿绿僵菌菌株对害虫的侵染致病能力,对于该菌株的侵染致病力也将有待进一步研究。

参考文献 (References)

- Alves SB, Tamai MA, Rossi LS, Castiglioni E, 2005. *Beauveria Bassiana*, pathogenicity to the citrus rust mite *Phyllocoptruta Oleivora*. *Experimental and Applied Acarology*, 37(1): 117–122.
- Ansari MA, Evans M, Butt TM, 2009. Identification of pathogenic strains of entomopathogenic nematodes and fungi for wireworm control. *Crop Protection*, 28(3): 269–272.
- Bartlett MC, Jaronski ST, 1988. Mass production of entomogenous fungi for biological control of insects//Burge MN (ed.). *Fungi in Biological Control Systems*. Manchester, UK: Manchester University Press. 61–85.
- Cai SP, He XY, Zeng LQ, Huang JS, Zhong JH, Ji BZ, 2012. Susceptibility of *Anoplophora chinensis* larvae to the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Chinese Journal of Biological Control*, 28(2): 293–297. [蔡守平, 何学友, 曾丽琼, 黄金水, 钟景辉, 嵇保中, 2012. 感染星天牛幼虫高致病力金龟子绿僵菌菌株的筛选. 中国生物防治学报, 28(2): 293–297.]
- Chen ZA, Huang JR, 1997. Assessment of virulence on strains from different origin in *Metarhizium anisopliae* for the white grub. *Microbiology China*, 24(2): 81–83. [陈祝安, 黄基荣, 1997. 不同来源绿僵菌对云斑金龟蛴螬致病力评价. 微生物学通报, 24(2): 81–83.]
- Chen ZA, Pan LC, 1995. Effect of different oils and carbohydrates on the germination of *Metarhizium* conidia. *Chinese Journal of Biological Control*, 11(1): 10–12. [陈祝安, 潘玲聪, 1995. 油和糖类对绿僵菌孢子萌发的影响. 中国生物防治, 11(1): 10–12.]
- Chen ZH, Xu L, Yang FL, Yang LH, 2014. Identification and stress resistance characters study of *Metarhizium anisopliae* isolate MAX-2. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 29(6): 834–839. [陈自宏, 徐玲, 杨凤连, 杨丽华, 2014. 绿僵菌菌株 MAX-2 鉴定及其抗逆性特性研究. 云南农业大学学报自然科学, 29(6): 834–839.]
- Du KS, Chai LY, Xu YL, Lang JF, 2008. Isolation of a *Metarhizium* strain. *Journal of Microbiology*, 28(6): 57–60. [杜开书, 柴立英, 徐艳聆, 郎剑锋, 2008. 一株绿僵菌的分离研究. 微生物学杂志, 28(6): 57–60.]
- Hou Y, Xia YF, Xu JQ, Liu FF, Lin XM, Du SF, 2015. Identification and biological characteristics of a *Metarhizium* strain and its virulence against oriental migratory locust. *Chinese Journal of Biological Control*, 31(3): 333–339. [侯颖, 夏彦飞, 徐建强, 刘芳芳, 林晓民, 都胜芳, 2015. 一株绿僵菌的鉴定、生物学特性及对东亚飞蝗的致病力. 中国生物防治学报, 31(3): 333–339.]
- Hu QB, 2004. Research advance of occurrence and control of underground pest grub in China. *Hubei Agricultural Science*, (6): 87–92. [胡琼波, 2004. 我国地下害虫蛴螬的发生与防治研究进展. 湖北农业科学, (6): 87–92.]
- Issaly N, Chauveau H, Aglevor F, Fargues J, Durand A, 2005. Influence of nutrient, pH and dissolved oxygen on the production of *Metarhizium flavoviride*, Mf189 blastospores in submerged batch culture. *Process Biochemistry*, 40(3): 1425–1431.
- Li JY, Xu QA, Dai XY, Wang GF, Ren SX, 2013. Study on the biological characteristics of *Metarhizium flavoviride*. *Guangdong Agricultural Sciences*, 40(9): 71–73. [李佳颖, 许齐爱, 代晓彦, 汪郭凰, 任顺祥, 黄绿绿僵菌 SM076 菌株生物学特性研究. 广东农业科学, 40(9): 71–73.]
- Li SY, Lei ZR, Li CR, 2007. Effects of medium and temperature on the growth and virulence of two strains of *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Yangtze University (Nature Science Edit)* Agri. Sci. V, 4(1): 4–7. [李树一, 雷仲仁, 李传仁, 2007. 培养基和温度对 2 株治蝗绿僵菌生长和毒力的影响. 长江大学学报(自然科学版): 石油/农学旬刊, 4(1): 4–7.]
- Lin HF, Li MY, Zhang SY, Li SG, Zhang CQ, 2011. Molecular biological identification of entomogenous fungi isolated from the

- brown planthopper. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(5): 1401–1406. [林华峰, 李茂业, 张松影, 李世广, 张承启, 2011. 一种褐飞虱病原真菌的分子生物学鉴定. *应用昆虫学报*, 48(5): 1401–1406.]
- Lin HF, Li SG, Zhang L, Wang PL, Zhou YW, 2006. Biological characteristics of *Metarhizium anisopliae* var. *major* and its virulence to white grubs. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 17(2): 351–353. [林华峰, 李世广, 张磊, 王萍莉, 周义文, 2006. 绿僵菌大孢变种的生物学特征及其对蛴螬的毒力研究. *应用生态学报*, 17(2): 351–353.]
- Liu SS, Li KB, Yin J, Cao YZ, 2008. Review of the researches on biological control of grubs. *Chinese Journal of Biological Control*, 24(2): 168–173. [刘树森, 李克斌, 尹姣, 曹雅忠, 2008. 蛴螬生物防治研究进展. *中国生物防治学报*, 24(2): 168–173.]
- Lu ZY, Gao S, Jiang Y, 2004. Screening of solid culture condition for *Metarhizium anisopliae*. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 10(2): 223–225. [卢忠燕, 高松, 江渝, 2004. 金龟子绿僵菌固体培养条件的筛选. *应用与环境生物学报*, 10(2): 223–225.]
- Miao CD, Hong K, 2007. Research progress on technology of fungi classification. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 35(22): 6695–6697. [缪承杜, 洪葵, 2007. 真菌分类技术的研究进展. *安徽农业科学*, 35(22): 6695–6697.]
- Pu ZL, Li ZZ, 1996. *Insect Mycology*. Hefei: Anhui Publishing House of Science and Technology. 245–264; 323–327; 553–554. [蒲蛰龙, 李增智, 1996. *昆虫真菌学*. 合肥: 安徽科学技术出版社. 245–264; 323–327; 553–554.]
- Qin XF, Lv WY, Du KS, Wang YB, 2007. Population survey and comprehensive management of grubs in lawn. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 36(2): 56–57. [秦雪峰, 吕文彦, 杜开书, 王运兵, 2007. 草坪蛴螬种群调查及综合治理研究. *河南农业科学*, 36(2): 56–57.]
- Shen JF, Wang ZK, Zhang JW, Yin YP, 2012. Identification of two *Metarhizium* species and bioassay of their virulence against the white grubs of peanut. *Chinese Journal of Biological Control*, 28(3): 334–340. [申剑飞, 王中康, 张建伟, 殷幼平, 2012. 两株绿僵菌菌株的分离鉴定及其对花生蛴螬的致病力. *中国生物防治学报*, 28(3): 334–340.]
- Song TT, Feng MG, 2011. In vivo passages of heterologous *Beauveria bassiana* isolates improve conidial surface properties and pathogenicity to *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 106(2): 211–216.
- Song Z, 2002. Submerged culture of *Metarhizium anisopliae*. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 23(2): 72–76. [宋漳, 2002. 金龟子绿僵菌液体深层培养研究. *热带作物学报*, 23(2): 72–76.]
- Song ZY, 2009. Study of isolation, identification and biological characteristics about strain CQMa117 of *Metarhizium* sp. Master's dissertation. Chongqing: Chongqing University. [宋章永, 2009. 绿僵菌 CQMa117 菌株的分离、鉴定及生物学特性的研究. 硕士学位论文. 重庆: 重庆大学.]
- Su Y, Nong XQ, Zhang ZH, 2010. Genetic polymorphism of *Metarhizium anisopliae* isolates and its association with geographic origin and host species. *Chinese Journal of Biological Control*, 26(4): 428–435. [苏宇, 农向群, 张泽华, 2010. 绿僵菌菌株遗传多态性与地理来源及寄主种群分化的关联性. *中国生物防治学报*, 26(4): 428–435.]
- Sun JB, Deng X, Song XS, 2007. Biological property and virulence measurement of *Metarhizium anisopliae*. *Forest By-Product and Speciality in China*, 88(3): 17–18. [孙家宝, 邓勋, 宋小双, 2007. 金龟子绿僵菌的生物学特性及毒力测定. *中国林副特产*, 88(3): 17–18.]
- Thomas KC, Khachatourians GG, Ingledew WM, Ingledew WM, 1987. Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. *Canadian Journal of Microbiology*, 33(1): 12–20.
- Wang G, Xiong Q, Tian F, Xie YP, Xue JL, 2013. Isolation and identification of a strain of *Metarhizium* and its virulence to *Carposina sasakii*. *Journal of Shanxi University (Natural Science Edition)*, 36(2): 275–281. [王刚, 熊琦, 田芬, 谢映平, 薛皎亮, 2013. 一株绿僵菌的分离鉴定及对桃小食心虫的致病力研究. *山西大学学报(自然科学版)*, 36(2): 275–281.]
- Wang M, Yin YP, Wang ZK, Liu JJ, Liao YF, 2014. Multilocus phylogenetic analysis of the taxonomic status of 10 strains of *Metarhizium*. *Plant Protection*, 40(5): 14–21. [王萌, 殷幼平, 王中康, 刘娟娟, 廖玉凤, 2014. 10 株绿僵菌菌株分类地位的多基因系统进化分析. *植物保护*, 40(5): 14–21.]
- Yan ZY, Xue ZD, Zeng LB, Yang RL, 2011. Isolation of a *Metarhizium* strain and its biological characteristics. *Plant Fiber Sciences In China*, 33(2): 84–88. [严智燕, 薛召东, 曾粮斌, 杨瑞林, 2011. 一株绿僵菌的分离、鉴定及其生物学特性的初步研究. *中国麻业科学*, 33(2): 84–88.]

- Yang LY, Gan L, Liu L, Wen MF, Huang JS, 2008. Optimization of environmental factors for the growth of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* strains MA4 and MAIm1. *Chinese Journal of Ecology*, 27(8): 1322–1326. [杨腊英, 甘露, 刘丽, 文明富, 黄俊生, 2008. 金龟子绿僵菌菌株生长环境变量的优化. 生态学杂志, 27(8): 1322–1326.]
- Yin YP, Song ZY, Xie N, Wang ZK, 2010. Nutrition requirement and culture characteristic of *Metarhizium anisopliae* strain CQMall7. *Chinese Journal of Biological Control*, 26(2): 206–210. [殷幼平, 宋章永, 谢宁, 王中康, 2010. 金龟子绿僵菌 CQMall7 的营养要求与培养特性初探. 中国生物防治, 26(2): 206–210.]
- Yu HH, Guo W, Li RJ, Lu XJ, Zhao D, 2014. Screening and molecular identification of *Metarhizium* strains against *Holotrichia oblita*. *Chinese Journal of Biological Control*, 30(6): 834–838. [于浩海, 郭巍, 李瑞军, 陆秀君, 赵丹, 2014. 对华北黑鳃金龟幼虫高毒力绿僵菌菌株的筛选及分子鉴定. 中国生物防治学报, 30(6): 834–838.]
- Yu YH, Long XZ, Zeng XR, Wei DW, Zeng T, 2014. Biological characteristics of a strain of *Metarhizium* that is highly pathogenic to *Dorystenes granulosus*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(1): 73–79. [于永浩, 龙秀珍, 曾宪儒, 韦德卫, 曾涛, 2014. 蔗根土天牛高致病力绿僵菌菌株的生物学特性研究. 应用昆虫学报, 51(1): 73–79.]
- Zhang MC, Yin J, Li KB, Zeng YZ, Wu JX, 2014. Research progress on the occurrences of white grub and its control. *China Plant Protection*, 34(10): 20–28. [张美翠, 尹姣, 李克斌, 曹雅忠, 仵均祥, 2014. 地下害虫蛴螬的发生与防治研究进展. 中国植保导刊, 34(10): 20–28.]
- Zhang JW, Wang ZK, Shen JF, Yin YP, 2012. Screening, identification and culture characteristics of a highly pathogenic strain of *Metarhizium* against *Plutella xylostella*. *Chinese Journal of Biological Control*, 28(1): 53–61. [张建伟, 王中康, 申剑飞, 殷幼平, 2012. 小菜蛾高致病力绿僵菌的筛选、鉴定及培养特性研究. 中国生物防治学报, 28(1): 53–61.]
- Zhang YB, Wu PP, Wang P, Liu J, Xu TS, Wang HJ, Shu JP, 2012. Identification and biological characteristics of a *Metarhizium pingshaense* strain isolated from *Melanotus cribricollis* larva. *Scientia Silvae Sinicae*, 48(12): 134–140. [张亚波, 吴盼盼, 王鹏, 刘剑, 徐天森, 王浩杰, 舒金平, 2012. 一株绿僵菌的鉴定及其生物学特性. 林业科学, 48(12): 134–140.]
- Zhang ZL, 1984. Chinese Economic Insects Fauna: Coleoptera, Scarabaeoidea, Larvae. Beijing: Science Press. 18–63. [张芝利, 1984. 中国经济昆虫志: 鞘翅目金龟总科幼虫. 北京: 科学出版社. 18–63.]
- Liu Z, Lei ZR, Hua BZ, Wang HH, Liu TX, 2010. Germination behavior of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) nymphs. *Journal of Entomological Science*, 45(4): 322–334.