

莱氏野村菌 Nr120815 菌株在不同 稻谷基质上的产孢特性研究*

杜广祖¹, 郑亚强¹, 陈 斌¹, 和淑琪^{1**}, 李正跃¹, 肖关丽^{2**}, 袁丽美¹

(1. 云南农业大学 植物保护学院, 微生物菌种筛选与应用国家地方联合工程研究中心, 云南 昆明 650201;

2. 云南农业大学 农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 室内研究了莱氏野村菌 Nr120815 在 12 种云南元阳哈尼地方水稻品种谷粒上的产孢量, 并对促产孢的碳源和氮源进行了筛选, 同时测定其对孢子萌发的影响。结果表明: 红糯谷上的产孢量和萌发率均最高, 分别为 $(1.84 \pm 0.15) \times 10^9 \text{ g}^{-1}$ 和 $(83.22 \pm 0.69)\%$ 。继而以红糯谷为培养基质, 以添加不同碳源和氮源为营养物质, 比较其产孢量和孢子萌发率的差异, 结果表明: 当添加单一碳源时, 添加 0.40% 的麦芽糖后产孢量和萌发率最高, 分别为 $(4.55 \pm 0.15) \times 10^9 \text{ g}^{-1}$ 和 $(85.00 \pm 1.00)\%$; 当添加单一氮源时, 添加 0.20% 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 后产孢量和萌发率均最高, 分别为 $(5.58 \pm 0.26) \times 10^9 \text{ g}^{-1}$ 和 $(86.00 \pm 1.32)\%$; 当同时添加碳源和氮源时, 麦芽糖和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的均为 0.20% 时产孢量最多, 为 $(7.09 \pm 0.05) \times 10^9 \text{ g}^{-1}$; 添加 0.60% 麦芽糖和 0.40% KNO_3 后的萌发率最高, 为 $(88.83 \pm 0.76)\%$ 。综合以上结果, 当以麦芽糖和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为碳源和氮源营养时, 二者均以 0.20% 质量分数添加可达到良好互作效应, 能用于有效孢子生产, 产孢量和孢子萌发率分别达 $(7.09 \pm 0.05) \times 10^9 \text{ g}^{-1}$ 和 $(83.67 \pm 1.04)\%$; 当以蔗糖和 NH_4NO_3 作为碳源和氮源营养时, 二者分别以 0.2% 和 0.40% 质量分数添加后互作效应明显, 产孢量和孢子萌发率分别为 $(6.39 \pm 0.14) \times 10^9 \text{ g}^{-1}$ 和 $(87.67 \pm 1.53)\%$, 可用于莱氏野村菌 Nr120815 有效孢子生产。

关键词: 莱氏野村菌; 稻谷; 产孢量; 孢子萌发率; 碳源; 氮源

中图分类号: S 476.12 文献标志码: A 文章编号: 1004-390X (2016) 05-0791-08

Study on the Sporulation Character of *Nomuraea rileyi* Nr120815 on Different Rice Grainsmatrix

DU Guangzu¹, ZHENG Yaqiang¹, CHEN Bin¹, HE Shuqi¹,
LI Zhengyue¹, XIAO Guanli², YUAN Limei¹

(1. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, National and Local Joint
Engineering Research Center for Screening and Application of Microbial Strains, Kunming 650201, China;

2. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: The spore production of *Nomuraea rileyi* Nr120815 on twelve species of rice grains was studied and the carbon source and nitrogen source nutrients for promoting the sporulation was screened in laboratory, and also its effect on the spore germination rate was measured. Results showed that Nr120815 grew well on the grain of Hongnuogu than other variety grains, and the highest spore production was on

收稿日期: 2015-08-02 修回日期: 2015-09-15 网络出版时间: 2016-09-20 09:27

* 基金项目: 中国烟草总公司云南省公司科技计划项目 (2014YN29); 云南省农业产业化专项 (2013 [364] 号)。

作者简介: 杜广祖 (1986—), 男, 河南新乡人, 博士, 主要从事害虫生物防治研究。

E-mail: 15288457381@163.com

** 通信作者 Corresponding authors: 和淑琪 (1976—), 女, 云南丽江人, 博士研究生, 讲师, 主要从事植物检疫及害虫综合防治研究。E-mail: chbins@163.com; 肖关丽 (1972—), 女, 云南昭通人, 博士, 教授, 主要从事农学与植物生理研究。E-mail: glxiao9@163.com

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20160920.0927.008.html>

Hongnuogu grains, with a sporulation capacity of $(1.84 \pm 0.15) \times 10^9 \text{ g}^{-1}$, also its spores with the highest germination rate of $(83.22 \pm 0.69)\%$. So that the spore production and its germination rate of Nr120815 cultured on Hongnuogu rice grains by adding different carbon and nitrogen source nutrients were tested in order to screen the best nutrients for sporulation and germination. Results indicated; the highest spore production and the spore germination was $(4.55 \pm 0.15) \times 10^9 \text{ g}^{-1}$ and $(85.00 \pm 1.00)\%$ respectively by adding 0.40% maltose as the single carbon source nutrient. The highest spore production and the spore germination was $(5.58 \pm 0.26) \times 10^9 \text{ g}^{-1}$ and $(86.00 \pm 1.32)\%$ respectively by adding 0.20% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as the single nitrogen source nutrient; but the highest spore production was $(7.09 \pm 0.05) \times 10^9 \text{ g}^{-1}$ after adding both the maltose and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ with concentration of 0.20% as the carbon and nitrogen source nutrient, and the highest spore germination rate was $(88.83 \pm 0.76)\%$ after adding the 0.60% maltose and 0.40% KNO_3 as the carbon and nitrogen source nutrient. Overall, the best interaction effect of the carbon and nitrogen source nutrients for the spore production of Nr120815 can be got by adding the 0.20% maltose and 0.20% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as carbon and nitrogen source nutrients, which with a sporulation capacity of $(7.09 \pm 0.05) \times 10^9 \text{ g}^{-1}$ and germination rate of $(83.67 \pm 1.04)\%$. The best interaction effect can be got when adding the 0.20% sucrose and 0.40% NH_4NO_3 as carbon and nitrogen source nutrients, which with a sporulation capacity of $(6.39 \pm 0.14) \times 10^9 \text{ g}^{-1}$ and germination rate of $(87.67 \pm 1.53)\%$.

Keywords: *Nomuraea rileyi*; rice grain; spore production; spore germination rate; carbon source nutrient; nitrogen source nutrient

莱氏野村菌 [*Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson], 又可称莱氏蛾霉, 隶属于半知菌亚门 (Deuteromycotina) 野村菌属 (*Nomuraea*)^[1], 是一种世界性广泛分布的虫生真菌, 该菌能寄生 40 多种昆虫, 对夜蛾科害虫的致病力和侵染力尤强^[2-3], 田间常引发斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*)、烟青虫 (*Helicoverpa assulata*)、棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*)、苜蓿绿夜蛾 (*Plathypena scabra*)、大豆夜蛾 (*Pseudoplusia includens*)、美洲棉铃虫 (*Heliothis zea*)、黎豆夜蛾 (*Anticarsia gemmatilis*)、粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 等多种害虫的疾病流行^[4-5]。因此, 该菌在农业害虫生物防治中具有重要的开发潜力^[6-7]。致病性繁殖体的规模生产是发挥虫生真菌生防潜能、提高害虫防治效果的关键^[8]。长期以来, 莱氏野村菌培养中对营养条件的苛刻要求, 制约着该菌的大规模生产及应用^[9]。

营养物质对虫生真菌生长及产孢基质和产孢条件的研究, 一直是虫生真菌基础研究的重要内容。LEITE 等^[8]研究了碳源和氮源对虫霉目巴科霉属、虫瘿霉属、新接霉属真菌生长的影响, 发现这些菌株在不同碳源培养基上的生长模式相似, 而在不同氮源培养基上存在着差异。LIU 等^[10-11]

报道了 3 种线虫寄生真菌对营养条件的需求并发现一些碳源和氮源在液体和固体发酵中对菌株生长有利, 另一些则不能被利用。对莱氏野村菌而言, 有研究表明以马耳他 (Maltova) 为原料的培养基上的生物量、菌丝生长及产孢量最高^[12]; 以查氏培养基为基础培养基, 促进产孢的最佳碳源是葡萄糖, 氮源是水解酪蛋白, 碳氮比为 15:1^[13]。由于基础培养基成本较高, 难以用于莱氏野村菌的大规模工业化生产, 许多学者开始寻找廉价的基质来替代或筛选基础培养基, 如大豆、小麦、燕麦、大米^[14]、粉碎的玉米粒^[15]、高粱^[6,16]、棉籽粉^[9]、丢弃的土豆和香蕉等^[17-19], 但未见碳源及氮源在替代培养基质上对产孢量和萌发率影响的系统报道。

本研究选择较易得的传统稻谷为研究对象, 筛选出产孢量和孢子萌发率较高的稻谷品种, 进而以该品种谷粒为培养基质, 以蔗糖、麦芽糖为碳源、以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4NO_3 和 KNO_3 为氮源, 分别比较单一碳源或氮源下的产孢能力和孢子萌发率以及碳源氮源对产孢能力的互作效应, 寻找适合莱氏野村菌菌株 Nr120815 最佳产孢量和孢子萌发率的碳氮配比, 为莱氏野村菌大规模生产应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株采自云南省昆明市晋宁县甘蓝 (*Brassica oleracea* L.) 上的罹病银纹夜蛾 (*Argyrogramma agnata* Staudinger) 幼虫, 室内采用萨式葡萄糖琼脂培养基 SDAY (葡萄糖 40 g, 蛋白胨 10 g, 酵母浸粉 10 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 000 mL) 分离、纯化后保存于云南农业大学植物保护学院昆虫病原体实验室。

供试培养基质为购自云南省红河哈尼族彝族自治州元阳县新街镇菁口村当地 12 个传统水稻品种, 分别为白角老粳、红糯谷、月亮谷、慢车糯谷、白皮糯谷、绿脚谷、小谷、红脚老粳、绿叶谷、紫糯谷、车甲谷、丑谷。

1.2 试验方法

1.2.1 莱氏野村菌的分离培养

将采集到的被莱氏野村菌感染的银纹夜蛾幼虫虫体, 采用 SDAY 培养基分离纯化, 得到莱氏野村菌野生菌株 Nr120815, 活化产孢后备用。

1.2.2 液体种子的制备

用体积分数 0.05% Tween-80 的无菌水配制分生孢子悬浮液, 接种到装有 50 mL 萨氏葡萄糖培养液 SDY (葡萄糖 40 g, 蛋白胨 10 g, 酵母浸粉 10 g, 蒸馏水 1 000 mL) 的 250 mL 三角瓶至终密度为 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, 于 26 ℃、180 r/min 摇床培养 3 d, 作为液体种子备用。

1.2.3 不同碳源与氮源浓度和对比对莱氏野村菌生长的影响

参照孔琼等^[13]和刘光英^[20]的方法, 将液体种子按 10% (mL:g) 分别接种到直径为 90 mm 的含有不同浓度配比的稻谷 [分别加入不同质量分数的蔗糖、麦芽糖、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4NO_3 和 KNO_3 、蔗糖 + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、蔗糖 + NH_4NO_3 、蔗糖 + KNO_3 、麦芽糖 + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、麦芽糖 + NH_4NO_3 、麦芽糖 + KNO_3] 上, 固体发酵含水量均控制在 60%, 于 24 ℃、光照 14L:10D 的人工气候箱恒温培养 9 d, 每处理设 3 个重复。具体配比见表 1。

1.2.4 产孢能力测定

产孢量测定: 将收集到的分生孢子粉用含 0.05% Tween-80 的无菌水溶解, 血球计数板计数孢子数, 换算成 1 g 干重固体基质所产生的分生孢子数量。

表 1 不同碳氮源质量分数 (w) 处理

Tab. 1 The treatment of different mass fractions (w) of carbon and nitrogen source

处理 treatment	w/%		
A	0.2	0.4	0.6
B	0.2	0.4	0.6
A + B	0.2 + 0.2	0.4 + 0.2	0.6 + 0.2
	0.2 + 0.4	0.4 + 0.4	0.6 + 0.4
	0.2 + 0.6	0.4 + 0.6	0.6 + 0.6

注: A 代表蔗糖或麦芽糖; B 代表 KNO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 或 NH_4NO_3 ; A + B 代表蔗糖 (麦芽糖) 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (KNO_3 、 NH_4NO_3) 复配。

Note: A represents sucrose or maltose; B represents KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ or NH_4NO_3 ; A + B represents sucrose (maltose) compounded with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (KNO_3 , NH_4NO_3).

孢子萌发率测定: 将收集到的孢子粉溶解到含 0.05% Tween-80 的无菌水, 放入 25 ℃ 恒温培养箱中, 24 h 后用血球计数板观察各处理分生孢子的萌发率, 每个处理重复 3 次, 每个重复观察 200 个分生孢子。

2 结果与分析

2.1 莱氏野村菌在不同稻谷上的产孢能力

2.1.1 产孢量

将莱氏野村菌液体种子接种到不同品种稻谷上培养, 结果显示 (表 2): 对于产孢量来说, 除了白皮糯谷和月亮谷间, 白脚老粳和小谷间, 白脚老粳、慢车糯谷、车甲谷和丑谷间, 绿脚谷和绿叶谷间不存在显著差异外, 其他品种间均存在着极显著性差异 ($F=247.87$, $P<0.01$)。其中产孢量最高的是红糯谷, 其次是月亮谷, 产孢量为 $(1.24 \pm 0.05) \times 10^9 \text{ g}^{-1}$, 与白皮糯差异不显著。从单位重量稻谷所含的谷粒数来看 (表 2), 100 g 不同水稻品种的谷粒数间存在极显著差异 ($F=3\,612.63$, $P<0.01$); 其中, 红糯谷的谷粒数最多, 其次为白皮糯谷, 绿脚谷的谷粒数最少, 仅为 $(3\,891.00 \pm 5.00) \times 10^{-2} \text{ g}^{-1}$ 。

2.1.2 不同稻谷上生产的孢子萌发率

从孢子萌发率来看 (表 2), 不同水稻品种谷粒上生产的孢子粉 24 h 的萌发率均达到了 60% 以上, 绿脚谷上生产的孢子萌发率最低, 并且与绿叶谷上生产的孢子萌发率无显著差异 ($F=0.14$, $P>0.05$); 而在红糯谷上生产的孢子萌发率最高; 且与白皮糯谷、月亮谷、紫糯谷和小谷上生产的孢子萌发率差异显著 ($F=134.08$, $P<0.05$)。

表 2 不同品种稻谷上莱氏野村菌产孢量、谷粒数及萌发率 ($\bar{x} \pm SD$)

Tab. 2 Spore production, spore germination rate of *N. rileyi* on rice grains of different varieties

序号 No.	品种 rice varieties	产孢量 $\times 10^9/\text{g}^{-1}$ spore production	谷粒数 $\times 10^{-2}/\text{g}^{-1}$ grain number	24 h 孢子萌发率/% spore germination rate after 24 h
1	绿脚谷 Lvjiaogu	0.23 $\pm$ 0.02 f	3 891.00 $\pm$ 5.00 h	61.78 $\pm$ 0.51 g
2	绿叶谷 Lvyegu	0.25 $\pm$ 0.02 f	4 170.00 $\pm$ 9.00 f	62.00 $\pm$ 0.88 g
3	白脚老粳 Baijiaolaojing	0.42 $\pm$ 0.04 de	4 288.00 $\pm$ 9.17 e	65.56 $\pm$ 0.51 ef
4	丑谷 Chougu	0.37 $\pm$ 0.05 e	4 152.00 $\pm$ 4.36 g	64.78 $\pm$ 0.84 f
5	红糯谷 Hongnuogu	1.84 $\pm$ 0.15 a	4 718.00 $\pm$ 25.06 a	83.22 $\pm$ 0.69 a
6	白皮糯谷 Baipinuogu	1.18 $\pm$ 0.03 b	4 600.00 $\pm$ 2.00 b	77.00 $\pm$ 1.00 b
7	月亮谷 Yuelianggu	1.24 $\pm$ 0.05 b	4 611.67 $\pm$ 5.69 b	74.44 $\pm$ 1.02 c
8	紫糯谷 Zinuogu	0.82 $\pm$ 0.03 c	4 391.67 $\pm$ 5.69 d	70.67 $\pm$ 0.88 d
9	小谷 Xiaogu	0.47 $\pm$ 0.04 d	3 888.33 $\pm$ 7.64 h	66.89 $\pm$ 1.02 e
10	慢车糯谷 Manchenuogu	0.36 $\pm$ 0.05 e	4 516.33 $\pm$ 10.50 c	65.11 $\pm$ 1.02 f
11	车甲谷 Chejiagu	0.35 $\pm$ 0.04 e	3 890.00 $\pm$ 8.00 h	64.89 $\pm$ 0.69 f
12	红脚老粳 Hongjiaolaojing	0.41 $\pm$ 0.03 de	4 165.33 $\pm$ 7.64 fg	65.00 $\pm$ 1.00 f

注：不同小写字母代表存在显著性差异 ($P < 0.05$)，下同。

Note: Data with different small letters in the same lines are of the significant difference ($P < 0.05$); the same as below.

综合产孢量和萌发率来看，在所选的稻谷品种中，红糯谷是培养莱氏野村菌分生孢子的最佳基质，其次是月亮谷或白皮糯谷。

2.2 促进产孢能力的营养物质筛选

2.2.1 不同碳源下的产孢量及孢子萌发率

以红糯谷为固体培养基质，添加不同质量分数的蔗糖或麦芽糖后接种莱氏野村菌液体种子，分析产孢量和萌发率的差异，结果表明：对于产孢量来说（图 1），除添加 0.40%、0.60% 的蔗糖间无明显差异外，其他质量分数间均存在极显著的差异（ $F = 297.82$, $P < 0.01$ ）。其中，添加 0.40% 的麦芽糖后产孢量最高，比纯谷粒的对照提高了

55.80%；其次为添加 0.20% 的蔗糖，比纯谷粒的对照提高了 35.60%；添加 0.40% 的蔗糖、0.60% 的蔗糖或 0.60% 的麦芽糖后与对照相比产孢量分别降低了 29.45%、34.25% 和 14.38%。

对于萌发率来说（图 2），添加 0.20% 蔗糖与添加 0.40% 麦芽糖后的孢子萌发率间无明显差异（ $F = 3.77$, $P > 0.05$ ），且均明显高于空白对照 CK，以后者的萌发率最高；而添加其他浓度的碳源后孢子萌发率均显著低于 CK，其中添加 0.40% 蔗糖与 0.60% 蔗糖间、添加 0.20% 麦芽糖与 0.60% 麦芽糖间的萌发率间均不存在显著差异（ $F = 7.36$, $P > 0.05$ ； $F = 0.71$, $P > 0.05$ ）。

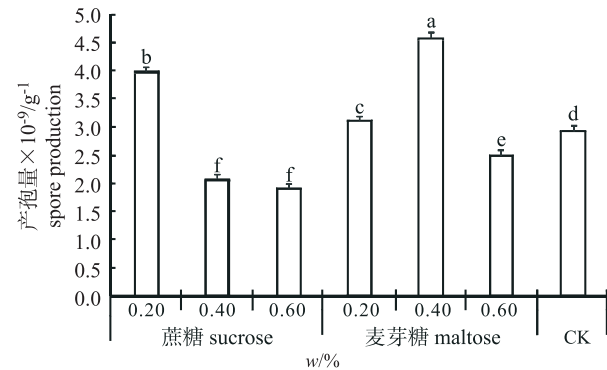


图 1 不同质量分数碳源对莱氏野村菌产孢量的影响
Fig. 1 Spore production of *N. rileyi* under the different mass fractions of carbon source nutrients

综合以上结果，在红糯谷谷粒中添加 0.20% 的蔗糖对莱氏野村菌 Nr120815 的产孢量和萌发率较有利。

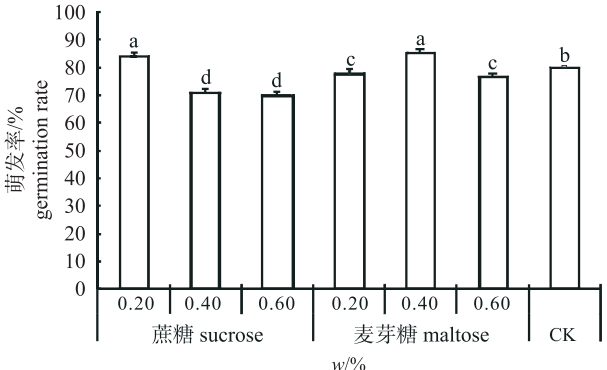


图 2 不同质量分数碳源对莱氏野村菌萌发率的影响
Fig. 2 Spore germination rate of *N. rileyi* under the different mass fractions of carbon source nutrients

2.2.2 不同氮源下的产孢量及孢子萌发率

在红糯谷谷粒上添加不同质量分数的氮源后分析产孢量和萌发率的差异，结果表明：对于产孢量

来说(图3),除了添加0.60%的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和0.20%的 NH_4NO_3 间,0.20%的 NH_4NO_3 、0.60%的 NH_4NO_3 和0.40%的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 三者间,0.40%的 NH_4NO_3 、0.60%的 NH_4NO_3 、0.40%的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 与空白对照CK四者间不存在显著性差异外,其他浓度间均存在极显著性差异($F = 294.45, P < 0.01$)。其中添加0.20%的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 后最高,比纯谷粒对照提高了91.10%;其次是添加0.40%的 KNO_3 ,比纯谷粒对

照提高了76.03%;产孢量最低的为添加0.20%的 KNO_3 ,比纯谷粒对照降低了1.66倍。

对于萌发率来说(图4),添加0.20% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 与添加0.40% KNO_3 后的萌发率间存在显著差异($F = 27.02, P < 0.01$),且以前者的萌发率最高,均显著高于空白对照CK的萌发率。而添加0.20% KNO_3 和添加0.60% KNO_3 后的萌发率均低于空白对照CK,且以添加0.20% KNO_3 后的萌发率最低。

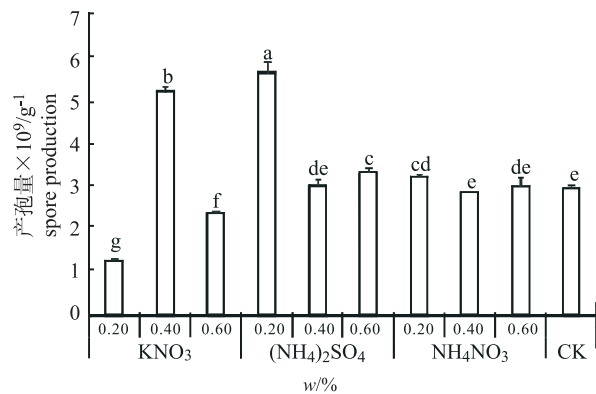


图3 不同质量分数氮源对莱氏野村菌产孢量的影响
Fig. 3 Spore production of *N. rileyi* under the different mass fractions of nitrogen source nutrients

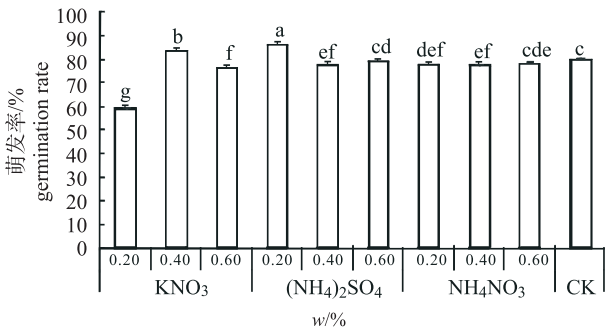


图4 不同质量分数氮源对莱氏野村菌萌发率的影响
Fig. 4 Spore germination rate of *N. rileyi* under the different mass fractions of nitrogen source nutrients

综上所述,在红糯谷谷粒中添加0.20%的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对莱氏野村菌Nr120815的产孢量和萌发率较有利。

2.3 碳源和氮源对产孢的互作效应

2.3.1 对产孢量的互作效应

从表3可知:当氮源为 KNO_3 时,不同质量

分数 KNO_3 与2种碳源配比间的产孢量均存在显著差异($P < 0.05$)。其中,当 KNO_3 质量分数为0.60%时,添加0.60%的麦芽糖或蔗糖时产孢量差异不显著;当 KNO_3 质量分数为0.40%,麦芽糖质量分数为0.60%时产孢量最高;而当 KNO_3 与麦芽糖的质量分数均为0.40%时产孢量最低。

表3 不同质量分数氮源与碳源对比对莱氏野村菌产孢量的影响 ($\bar{x} \pm \text{SD}$)

Tab. 3 Spore production of <i>N. rileyi</i> under the different mass fractions of carbon source and nitrogen source nutrients		$\times 10^9 \text{ g}^{-1}$					
养分 nutrients		蔗糖 sucrose			麦芽糖 maltose		
		0.20%	0.40%	0.60%	0.20%	0.40%	0.60%
KNO_3	0.20%	4.25 ± 0.14 Ba	4.04 ± 0.09 Ca	1.32 ± 0.10 Eb	1.92 ± 0.05 Dc	5.30 ± 0.11 Aa	1.19 ± 0.06 Ec
	0.40%	2.37 ± 0.21 Cc	2.45 ± 0.16 Cb	1.31 ± 0.11 Db	5.69 ± 0.12 Ba	1.09 ± 0.07 Dc	6.83 ± 0.10 Aa
	0.60%	3.02 ± 0.84 Cb	1.89 ± 0.18 Dc	5.19 ± 0.07 Aa	2.91 ± 0.06 Cb	4.23 ± 0.06 Bb	5.34 ± 0.07 Ab
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.20%	5.52 ± 0.43 Ca	2.79 ± 0.05 Da	2.40 ± 0.11 Ea	7.09 ± 0.05 Aa	6.18 ± 0.31 Ba	2.90 ± 0.08 Db
	0.40%	2.99 ± 0.12 Cb	2.79 ± 0.07 Da	2.14 ± 0.03 Eb	5.93 ± 0.08 Ab	5.65 ± 0.19 Bb	5.81 ± 0.06 ABa
	0.60%	5.17 ± 0.05 Ba	2.86 ± 0.05 Ca	1.39 ± 0.06 Ec	5.58 ± 0.14 Ac	2.82 ± 0.14 Cc	2.48 ± 0.02 Dc
NH_4NO_3	0.20%	5.26 ± 0.03 Bb	5.49 ± 0.14 Bb	5.87 ± 0.10 Aa	5.91 ± 0.05 Aa	3.94 ± 0.03 Cb	3.65 ± 0.38 Cb
	0.40%	6.39 ± 0.14 Aa	5.64 ± 0.19 Bab	3.70 ± 0.05 Db	1.74 ± 0.05 Ec	5.75 ± 0.04 Ba	3.98 ± 0.04 Cb
	0.60%	3.90 ± 0.05 Cc	5.90 ± 0.06 Aa	2.55 ± 0.18 Ec	1.88 ± 0.07 Fb	2.89 ± 0.08 Dc	5.54 ± 0.15 Ba

注:同一行中不同大写字母代表存在极显著差异($P < 0.01$);同一列中不同小写字母代表存在极显著差异($P < 0.01$),下同。

Note: Data different capital letters in the same line and different small letters in the same column are of the significant difference ($P < 0.01$); the same as below.

当氮源为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 时,除了 0.40% 的蔗糖与所有 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数配比间不存在显著性差异外 ($F = 1.37, P > 0.05$),其他配比间均存在显著性差异。其中,当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的质量分数为 0.20% 时,添加 0.20% 的麦芽糖后产孢量最高,当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的质量分数为 0.60% 时,添加 0.60% 的蔗糖时产孢量最低 (表 3)。

当氮源为 NH_4NO_3 时,各个配比间均存在显著性差异 ($P < 0.05$)。其中,当 NH_4NO_3 的质量分数为 0.40%,蔗糖质量分数为 0.20%

时产孢量最高,而当 NH_4NO_3 的质量分数为 0.40%,麦芽糖质量分数为 0.20% 时的产孢量最低 (表 3)。

2.3.2 对孢子萌发的互作效应

从表 4 可知:当氮源为 KNO_3 时,以 0.60% 麦芽糖与 0.40% KNO_3 混合后的萌发率最高,显著高于空白对照 CK 的萌发率 ($F = 216.07, P < 0.01$);而 0.60% 麦芽糖与 0.20% KNO_3 混合后的萌发率最低,显著低于空白对照 CK 的萌发率 ($F = 1\,011.50, P < 0.01$)。

表 4 不同质量分数氮源与碳源配比条件下莱氏野村菌萌发率的影响

Tab. 4 Spore germination rate of *N. rileyi* under the different mass fractions of carbon and nitrogen source nutrients %

养分 nutrients		蔗糖 sucrose			麦芽糖 maltose		
		0.20%	0.40%	0.60%	0.20%	0.40%	0.60%
KNO_3	0.20%	83.67 ± 0.76 ABa	82.83 ± 0.76 Ba	64.67 ± 0.76 Db	68.00 ± 1.80 Cc	85.00 ± 1.00 Aa	59.83 ± 0.76 Ec
	0.40%	73.67 ± 1.76 Bc	73.17 ± 2.57 Bb	66.50 ± 1.80 Cb	86.67 ± 0.76 Aa	62.33 ± 0.76 Dc	88.83 ± 0.76 Aa
	0.60%	79.50 ± 1.50 Cb	70.33 ± 0.76 Eb	85.33 ± 0.76 Aa	73.67 ± 0.29 Db	82.33 ± 1.04 Bb	86.83 ± 0.29 Ab
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.20%	86.67 ± 0.76 Ba	74.67 ± 0.76 Cb	74.50 ± 1.00 Ca	88.67 ± 0.58 Aa	87.17 ± 1.04 ABa	73.00 ± 1.32 Cb
	0.40%	76.00 ± 0.50 Cc	77.33 ± 1.53 Cab	71.17 ± 0.76 Db	88.00 ± 1.00 Aa	85.67 ± 0.76 Ba	86.17 ± 1.04 Ba
	0.60%	84.50 ± 1.00 Ab	79.67 ± 3.33 Ba	62.33 ± 1.26 Dc	86.33 ± 0.29 Ab	72.83 ± 1.26 Cb	71.67 ± 0.76 Cb
NH_4NO_3	0.20%	86.33 ± 0.76 Aa	86.00 ± 0.50 Aa	86.50 ± 1.00 Aa	86.67 ± 0.76 Aa	83.67 ± 1.04 Ba	80.50 ± 1.32 Cb
	0.40%	87.67 ± 1.53 Aa	83.50 ± 1.00 Bb	80.83 ± 0.29 Cb	66.67 ± 1.04 Dc	84.83 ± 0.76 Ba	83.33 ± 0.76 Ba
	0.60%	82.67 ± 0.76 bB	85.83 ± 1.04 Aa	76.67 ± 1.53 Cc	68.50 ± 0.50 Eb	73.67 ± 0.76 Db	84.33 ± 0.29 Aa

当氮源为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 时,以 0.20% 麦芽糖与 0.20% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 混合后的萌发率最高,显著高于空白对照 CK 的萌发率 ($F = 265.09, P < 0.01$);而 0.60% 蔗糖与 0.60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 混合后的萌发率最低,显著低于空白对照的萌发率 ($F = 416.00, P < 0.01$) (表 4)。

当氮源为 NH_4NO_3 时,以 0.20% 蔗糖与 0.40% NH_4NO_3 混合添加后,孢子萌发率最高,显著高于空白对照 CK 的萌发率 ($F = 65.83, P < 0.01$);而 0.20% 麦芽糖与 0.40% NH_4NO_3 混合后的萌发率最低,显著低于空白对照的萌发率 ($F = 304.20, P < 0.01$) (表 4)。

综上所述,当同时添加 0.20% 麦芽糖与 0.2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为碳源和氮源营养时,可达到最佳的互作效应,此时产孢量为 $(7.09 \pm 0.05) \times 10^9 \text{ g}^{-1}$ 干重,孢子萌发率达 $(83.67 \pm 1.04)\%$,其次是当同时添加 0.2% 的蔗糖与 0.40% 的 NH_4NO_3 作为碳源和氮源营养时,也能表现出明显的互作效应,其产孢量和孢子萌发率分别为 $(6.39 \pm 0.14) \times 10^9 \text{ g}^{-1}$,

$(87.67 \pm 1.53)\%$ 。

3 讨论

莱氏野村菌作为重要的虫生真菌,由于其寄主广泛、自然流行性强,长期以来受到许多学者的关注。分生孢子的大量生产是制约生防真菌制剂开发研究的难点之一,也一直是虫生真菌研究的热点问题之一。本研究通过以稻谷为培养基质,通过对不同碳源和氮源的筛选优化,结果表明:云南省红河州元阳县 12 种当地水稻品种中,莱氏野村菌分生孢子在红糯谷谷粒上的产孢量最高,但低于棉籽粉与米糠的复配基质^[9]及大豆基质上的产孢量^[14],而高于大米基质上的产孢量^[14]。

本研究发现:以云南传统稻谷红糯谷为基质,添加 0.40% 的麦芽糖后产孢量最高,添加 0.20% 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 后产孢量最多,且当添加 0.20% 的麦芽糖和 0.20% 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 时对产孢的互作效应明显,无论是单一碳源或氮源营养,还是在碳源和氮源互作条件下,其产孢量均高于大豆

基质和粉碎的玉米粒上的产孢量,表现出明显的产孢优势;然而与大米及小麦培养基质上的产孢量相比,除了共同添加 0.20% 的麦芽糖和 0.20% 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 时的产孢量高于大豆基质和粉碎的玉米粒外,添加单一碳源或氮源营养后产孢量均低于大豆基质和粉碎的玉米粒^[14-15]。其原因是否是由于该研究中选用的稻谷与其他学者采用的大豆、玉米、大米及小麦所含有的营养物质不同有关,将是值得进一步探讨的内容。

JENKINS 等^[21]认为真菌定植后谷粒的大小和形状、水合性质、结构完整性等物理性状可能也会影响到固体发酵和产孢,这与 PHAM 等^[22]发现大米适合球孢白僵菌固体发酵的研究结果一致。而本研究也发现相同质量的水稻品种谷粒数间也存在显著性差异,其中红糯谷的谷粒个体较小,每 100 g 所含谷粒数最多,单位重量谷粒具有更大的表面积,分生孢子在稻谷的表面生长,更有利于充分利用稻粒中的营养成分,这也许是造成红糯谷上产孢量最高的原因之一。此外,有研究认为微量元素、氨基酸、金属离子、维生素等营养物质以及水分含量均会对昆虫病原真菌的生长及产孢产生影响^[13-14, 23-25],本研究发现不同品种谷粒间除了粒径有差异外,谷粒颜色、糯性与否等方面也存在一定的差异,即不同品种谷粒本身的性质(维生素、pH 值等)、灭菌后的含水量等方面存在一定差异,使得不同品种稻谷上的产孢能力存在差异,具体原因有待于进一步地研究。

由于相对于大豆等农副产品,稻谷更加易得、成本相对较低,可以作为莱氏野村菌分生孢子大量生产的培养基质,此外,孢子的毒力也是影响田间防治效果的重要评价指标之一,进一步对分生孢子的毒力进行测定,寻找最佳的保存分生孢子及提高毒力的方法,这将为该菌的商品化生产奠定理论基础。

[参考文献]

- [1] 裘维蕃. 菌物学大全 [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 837.
- [2] BOUCIAS D, BRADFORD D L, BARFIELD C S. Susceptibility of the velvetbean caterpillar and soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) to *Nomuraea rileyi*: effects of pathotype, dosage, temperature, and host age [J]. Journal of Economic Entomology, 1984, 77 (1): 247.
- [3] FUXA J R. Dispersion and spread of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (Moniliales: Moniliaceae) in a soybean field [J]. Environmental Entomology, 1984, 13 (1): 252.
- [4] SRISUKCHAYAKUL P, WIWAT C, PANTUWATANA S. Studies on the pathogenesis of the local isolates of *Nomuraea rileyi* against *Spodoptera litura* [J]. Science Asia, 2005, 31: 273.
- [5] 李世广, 林华峰, 徐庆丰, 等. 几种虫生真菌对烟青虫的致病性研究 [J]. 安徽农业大学学报, 2001, 28 (4): 376.
- [6] DEVI P S V. Conidia Production of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* and its evaluation for control of *Spodoptera litura* (Fab) on ricinus communis [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1994, 63 (2): 145.
- [7] SHANTHAKUMAR S P, MURALI P D, MALARVANNAN S, et al. Laboratory evaluation on the potential of entomopathogenic fungi, *Nomuraea rileyi* against tobacco caterpillar, *Spodoptera litura* Fabricius (Noctuidae: Lepidoptera) and its safety to *Trichogramma* sp [J]. Journal of Biopesticides, 2010, 3 (1): 132.
- [8] LEITE L G, ALVES S B, FILHO A B, et al. Effect of salts, vitamins, sugars and nitrogen sources on the growth of three genera of *Entomophthorales*: *Bathkoa*, *Furia*, and *Neozygites* [J]. Mycological Research, 2003, 107 (7): 872.
- [9] 冯冬梅. 莱氏野村菌 [*Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson] 生长和产孢条件的探索 [J]. 西南农业学报, 1989, 2 (2): 57.
- [10] LIU X Z, CHEN S Y. Nutritional requirements of the nematophagous fungus *Hirsutiella rhossiliensis* [J]. Biocontrol Science and Technology, 2002, 12 (3): 381.
- [11] LIU X Z, CHEN S Y. Nutritional requirements of *Pochonia chlamydosporia* and ARF18, fungi parasites of nematode eggs [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2003, 83 (1): 10.
- [12] RAJAN S T, MUTHUKRISHNAN N. Influence of various health drinks media on growth and sporulation of *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson isolates [J]. Journal of Biopesticides, 2010, 3 (2): 463.
- [13] 孔琼, 袁盛勇, 吴志刚, 等. 营养物质对莱氏野村菌 MZ060806 生长的影响 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2010, 38 (5): 204.
- [14] 林健文, 罗志兵, 骆星丹, 等. 莱氏野村菌固体发酵培养基筛选与发酵条件优化 [J]. 植物保护学报, 2009, 36 (5): 437.
- [15] MÉNDEZ A, POZO E D, GARCÍA I, et al. Evaluation of solid substrates for mass production of *Nomuraea rileyi*

- (Farlow) Samson [J]. *Revista de Protección Vegetal*, 2010, 25 (2): 108.
- [16] DEVI P S V, CHOWDARY A, PRASAD Y G. Cost-effective multiplication of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (F) Samson [J]. *Mycopathologia*, 2000, 151 (1): 35.
- [17] THAKRE M, THAKUR M, MALIK N, et al. Mass scale cultivation of entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* using agricultural products and agro wastes [J]. *Journal of Biopesticides*, 2011, 4 (2): 176.
- [18] TINCILLEY A, EASWARAMOORTHY S, SANTHALAKSHMI G. Attempts on mass production of *Nomuraea rileyi* on various agricultural products and by-products [J]. *Journal of Biological Control*, 2004, 18 (1): 35.
- [19] BALARDIN R S, LOCH L C. Semisynthetic culture media for *Nomuraea rileyi* massal production [J]. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 1989, 24 (3): 375.
- [20] 刘光英. 莱氏野村菌 (*Nomuraea rileyi*) 的固体发酵及分生孢子活力的研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2011.
- [21] JENKINS NE, HEVIEFO G, LANGEWALD J, et al. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides [J]. *Biocontrol News and Information*, 1998, 19 (1): 21.
- [22] PHAM T A, KIM J J, KIM K. Optimization of solid-state fermentation for improved conidia production of *Beauveria bassiana* as a mycoinsecticide [J]. *Mycobiology*, 2010, 38 (2): 137.
- [23] 刘春来, 李新民, 王克勤, 等. 微量元素及维生素对蜡蚧轮枝菌分生孢子的影响 [J]. *黑龙江农业科学*, 2008, (4): 9.
- [24] 彭小东, 唐维媛, 吕锡斌, 等. 不同营养物质对莱氏野村菌 Nr16 生长的影响 [J]. *贵州农业科学*, 2013, 41 (2): 115.
- [25] 张淑红, 段晓静, 王建伟. 氨基酸和维生素对白僵菌生长的影响 [J]. *唐山师范学院学报*, 2008, 30 (2): 51.