

两步培养法测定厚垣孢普可尼亚菌产孢的最佳条件

石妍, 肖顺, 刘国坤, 张绍升* (福建农林大学植物保护学院, 福建福州 350002)

摘要 [目的] 探讨厚垣孢普可尼亚菌产厚垣孢子的条件。[方法] 采用两步培养法测定碳源、氮源、碳氮摩尔比、pH 等不同营养环境条件对厚垣孢普可尼亚菌 PC021120-152 菌株产厚垣孢子的影响。[结果] PC021120-152 菌株的最佳产厚垣孢子条件为: 初始碳源浓度为 3.00 g/L, 碳氮摩尔比为 2.5:1, 最佳碳氮源组合为蔗糖/NaNO₃, 培养基最佳 pH 为 8.0。PC021120-152 菌株的最佳产分生孢子条件为: 初始碳源浓度为 3.00 g/L, 碳氮摩尔比为 2.5:1, 最佳碳氮源组合为 D-果糖/NaNO₃, 最佳 pH 为 5.0。[结论] 该研究结果可为厚垣孢普可尼亚菌生防制剂的生产调控提供依据。

关键词 厚垣孢普可尼亚菌; 产孢; 营养条件

中图分类号 S432.4⁴ **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)26-0016-04

Optimum Conditions for Sporulation of *Pochonia chlamyosporia* in Two-stage Cultivation

SHI Yan, XIAO Shun, LIU Guo-kun, ZHANG Shao-sheng* (College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002)

Abstract [Objective] To discuss the nutritional conditions for sporulation of *Pochonia chlamyosporia*. [Method] A two-stage cultivation method was used to determine the effects of various nutritional and environmental conditions (carbon sources, nitrogen sources, carbon-nitrogen molar ratio, and pH) on the sporulation of *P. chlamyosporia* PC021120-152. [Result] Chlamyospore production of PC021120-152 strains was the highest when the initial carbon concentration was 3.00 g/L; the carbon-nitrogen molar ratio was 2.5:1; sucrose/NaNO₃ was as the carbon/nitrogen source, and the pH was 8. Conidiophore production of PC021120-152 strains was the highest when the initial carbon concentration was 3.00 g/L; the carbon-nitrogen molar ratio was 2.5:1; D-fructose/NaNO₃ was as the carbon/nitrogen source, and the pH was 5.0. [Conclusion] The research provides references for industrialization of biocontrol agents of *P. chlamyosporia*.

Key words *Pochonia chlamyosporia*; Sporulation; Nutritional conditions

厚垣孢普可尼亚菌 (*Pochonia chlamyosporia*) 是根结线虫和胞囊线虫卵及雌虫的寄生菌^[1], 是国内外目前研究较多的线虫寄生真菌之一, 在无性世代能产生大量砖格状的、对高温、干旱和营养贫瘠等不良环境具有强耐受力的厚垣孢子, 使其易在土壤中存活^[1-2]。此外, 厚垣孢普可尼亚菌对植物不具有致病性^[2], 是一种具有开发应用前景的线虫生防真菌。研究表明, 营养环境条件对真菌产孢的类型有较大的影响, 可通过营养环境条件的改变来控制生产所需的孢子类型, 以获得耐受力(耐干燥、高温)较强的孢子。笔者采用两步培养法探讨碳源、氮源、碳氮比、pH 等不同营养环境条件对厚垣孢普可尼亚菌 PC021120-152 菌株产厚垣孢子的影响, 以期为其固态扩大培养提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株 厚垣孢普可尼亚菌菌株 PC021120-152, 由福建农林大学植物线虫学实验室分离、鉴定并保存。

1.2 真菌孢子悬浮液的制备 PDA 斜面菌种活化后, 加入适量无菌水, 用接种针刮取菌落表面, 用微型旋涡混合仪振荡使孢子均匀分散, 使用血球计数板计数后, 再用无菌水将孢子悬浮液浓度调至 10⁶ 个/mL, 备用。

1.3 营养环境条件对厚垣孢普可尼亚菌产孢的影响

1.3.1 碳源。 基础培养基 (Czapek 培养基)^[3]: 蔗糖 30.00 g/L、NaNO₃ 2.00 g/L、K₂HPO₄ 1.00 g/L、FeSO₄·7H₂O 0.01 g/L、KCl 0.50 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.50 g/L、琼脂 18.00 g/L, pH 自然。

用相同碳量的碳源代替基础培养基中的蔗糖为碳源。供试碳源为: 葡萄糖、乳糖、D-果糖、可溶性淀粉。以无碳源基础培养基为对照 (CK), 3 次重复。

1.3.2 氮源。 用相同氮量的氮源代替基础培养基中的 NaNO₃ 为氮源。供试氮源为: NH₄Cl、脲 (CH₄N₂O)、L-酪氨酸 (C₉H₉NO₃)、甘氨酸 (C₂H₅NO₂)。以无氮源基础培养基为对照 (CK), 3 次重复。

1.3.3 碳氮源组合。 根据碳氮源单因素试验, 以可溶性淀粉、蔗糖、D-果糖为碳源, 以 NaNO₃、L-酪氨酸为氮源, 配成 6 种不同碳氮源组合的培养基。3 次重复。

1.3.4 碳氮比 (摩尔比)。 根据筛选出的最佳碳氮源, 设定碳源起始浓度为 3.00、6.00、12.00、24.00 g/L; 氮源起始浓度为 0.35、0.70、1.40、2.80 g/L; 16 种不同碳氮浓度组合所得的碳氮比范围为: 1.25:1~80.00:1。3 次重复。

1.3.5 pH。 根据上述试验结果配制培养基, 灭菌前用 1.0 mol/L HCl 和 1.0 mol/L NaOH 调节培养基的 pH, 分别为 4、5、6、7、8、9。以不调整 pH 的培养基为对照 (CK), 3 次重复。

1.4 试验方法

1.4.1 两步培养法。 参考 Sun 等^[4] 的方法, 稍做改动。① 在培养皿中倒入基础培养基后, 在培养基表面放无菌玻璃纸 (φ7.5 cm)。将孢子悬浮液 (接种量为 100 μL) 接种到玻璃纸上, 用无菌玻璃刮铲来回充分涂匀。正面静置 20~30 min, 用 parafilm 封口。28 °C 下倒置黑暗培养, 3 次重复。② 4 d 后, 将玻璃纸移至不同营养环境条件的新鲜培养基中进行产孢培养。培养 7 d 后, 用镊子轻刮玻璃纸上的菌落, 然后将菌落放入装有 100 mL 体积分数为 0.15% 的吐温-80 溶液的三角瓶中, 置于微型旋涡混合仪上充分涡旋混合, 稀释成一定倍数后, 取样, 计孢子数, 3 次重复。

基金项目 中国烟草总公司福建公司科技项目 (闽烟 2012[041] 号)。
作者简介 石妍 (1986-), 女, 福建三明人, 助理实验师, 硕士, 从事微生物发酵方面的研究。* 通讯作者, 教授, 博士生导师, 从事植物病理学方面的研究。

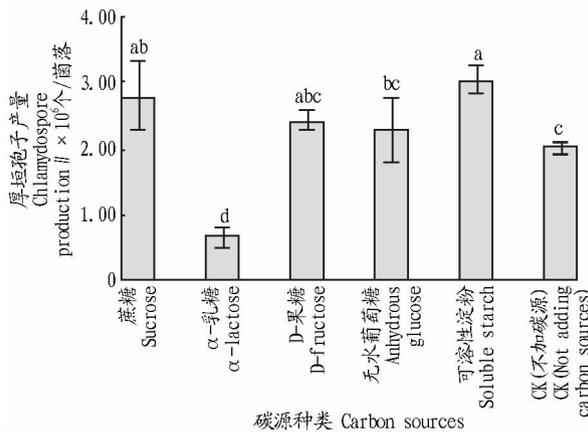
收稿日期 2016-07-11

1.4.2 孢子计数。分生孢子使用血球计数板计数;厚垣孢子由于其直径(20~25 μm)较大,不易用血球计数板计数,故用以下方法计数:用移液枪吸取 20 μL 孢子悬浮液于载玻片上,盖上盖玻片,置于光学显微镜下逐一计数,3次重复。

1.5 数据处理 采用 Excel 2010 进行数据统计与绘图,使用 DPS 软件进行数据处理,方差分析采用 Duncan's 新复极差法。

2 结果与分析

2.1 不同碳源对厚垣孢普可尼亚菌产孢的影响 从图 1、2 可以看出,5 种碳源对菌株 PC021120-152 产孢有显著影响。可溶性淀粉最有利于产厚垣孢子,培养结束时产孢量达到 3.04×10^6 个/菌落,其中 α -乳糖的产孢量少于对照。就产分生孢子而言,以蔗糖为碳源的培养基中产孢量最大,达到 2.17×10^9 个/菌落。5 种碳源产分生孢子量均高于对照。由此可见,供试菌株 PC021120-152 产分生孢子和产厚垣孢子所需的最佳碳源不同。

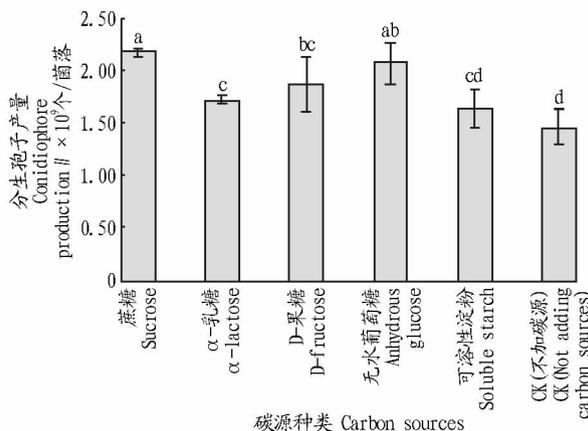


注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Note: Different letters mean significant differences ($P < 0.05$).

图 1 不同碳源对厚垣孢普可尼亚菌产厚垣孢子的影响

Fig. 1 Effects of carbon sources on chlamydospore production of *P. chlamydosporia*



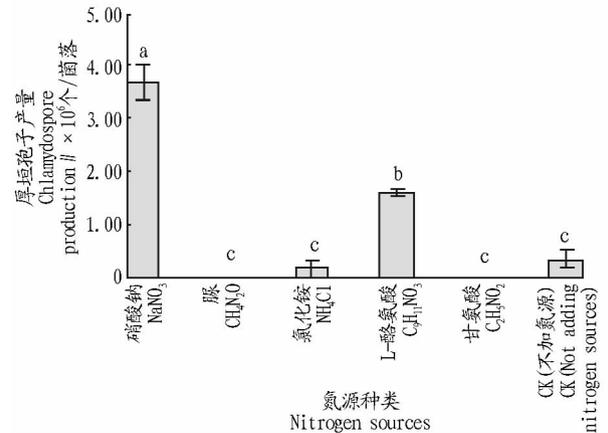
注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Note: Different letters mean significant differences ($P < 0.05$).

图 2 不同碳源对厚垣孢普可尼亚菌产分生孢子的影响

Fig. 2 Effects of carbon sources on conidiophore production of *P. chlamydosporia*

2.2 不同氮源对厚垣孢普可尼亚菌产孢的影响 从图 3 可以看出,厚垣孢普可尼亚菌 PC021120-152 在以 NaNO_3 为氮源的培养基中产厚垣孢子量最大,为 3.50×10^6 个/菌落,其次为 L-酪氨酸,其他 3 种氮源的产孢量均低于对照。就产分生孢子而言,也是 NaNO_3 最利于产分生孢子,以脲、 NH_4Cl 、甘氨酸为氮源的处理产分生孢子量低于对照(图 4)。由此可见,以 NaNO_3 为氮源,既有利于产厚垣孢子,又有利于产分生孢子。

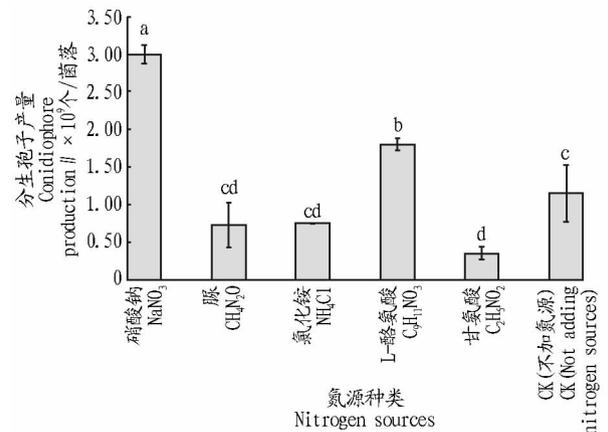


注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Note: Different letters mean significant differences ($P < 0.05$).

图 3 不同氮源对厚垣孢普可尼亚菌产厚垣孢子的影响

Fig. 3 Effects of nitrogen sources on chlamydospore production of *P. chlamydosporia*



注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Note: Different letters mean significant differences ($P < 0.05$).

图 4 不同氮源对厚垣孢普可尼亚菌产分生孢子的影响

Fig. 4 Effects of nitrogen sources on conidiophore production of *P. chlamydosporia*

2.3 最佳碳氮源组合的确定 由表 1 可知,产厚垣孢子量最大的碳氮源组合为蔗糖/ NaNO_3 ,其次为可溶性淀粉/ NaNO_3 和 D-果糖/ NaNO_3 ,与其他碳氮源组合差异显著;D-果糖/ NaNO_3 的碳氮源组合分生孢子产量最大,其次为蔗糖/ NaNO_3 组合。

2.4 碳源浓度和碳氮摩尔比对厚垣孢普可尼亚菌产孢的影响 从表 2 可以看出,碳源浓度、碳氮摩尔比对菌株 PC021120

表1 不同碳氮源组合对厚垣孢普可尼亚菌产孢的影响

Table 1 Effects of carbon and nitrogen combinations on sporulation of *P. chlamydosporia*

碳源 Carbon sources	氮源 Nitrogen sources	厚垣孢子产量 Chlamydospore production ×10 ⁵ 个/菌落	分生孢子产量 Conidiophore production ×10 ⁸ 个/菌落
可溶性淀粉 Soluble starch	NaNO ₃	8.38 ± 0.39 a	12.60 ± 1.48 c
	L-酪氨酸	2.20 ± 0.79 c	7.23 ± 0.04 d
蔗糖 Sucrose	NaNO ₃	8.98 ± 0.54 a	15.60 ± 1.56 b
	L-酪氨酸	5.43 ± 0.74 b	4.95 ± 0.07 de
D-果糖 D-fructose	NaNO ₃	7.75 ± 0.15 ab	18.80 ± 0.04 a
	L-酪氨酸	2.48 ± 0.32 c	3.88 ± 0.32 e

注: 同列不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Different lowercase letters in the same column mean significant differences ($P < 0.05$).

-152 产厚垣孢子量有显著的影响。当碳源起始浓度为3.00 g/L时,碳氮摩尔比为2.5:1的处理的产孢量是所有处理中最大的,达 24.00×10^5 个/菌落。当碳源浓度较低时(3.00和6.00 g/L),碳氮摩尔比小的处理(碳氮摩尔比为2.5:1)厚垣孢子产量较大。当碳源浓度较高时(12.00和24.00 g/L),碳氮摩尔比大的处理(碳氮摩尔比为20:1)厚垣孢子产量较大。当碳源浓度为24.00 g/L时,所有处理的产孢量开始减少。

碳源浓度和碳氮摩尔比对菌株 VC021120-152 产分生孢子也有显著的影响。当碳源浓度为3.00 g/L,碳氮摩尔比为2.5:1的处理产孢量也最大,达到 31.80×10^8 个/菌落,与其他处理差异达到显著水平 ($P < 0.05$)。

表2 碳源浓度和碳氮比对厚垣孢普可尼亚菌产分生孢子的影响

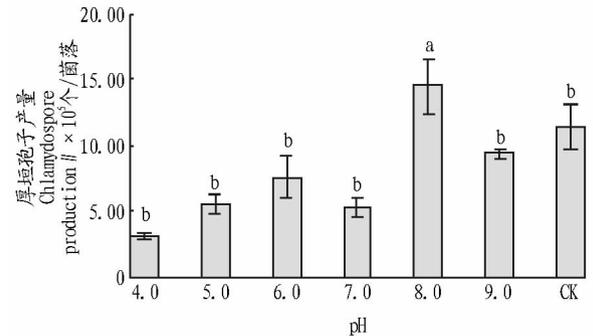
Table 2 Effects of carbon concentration and carbon-nitrogen molar ratio on sporulation of *P. chlamydosporia*

碳源浓度 Carbon concentration g/L	碳氮摩尔比 Carbon-nitrogen molar ratio	厚垣孢子产量 Chlamydospore production ×10 ⁵ 个/菌落	分生孢子产量 Conidiophore production ×10 ⁸ 个/菌落
3.0	10:1	7.33 ± 0.16 bh	7.35 ± 0.90 def
3.0	5:1	9.08 ± 0.04 f	6.43 ± 0.26 efg
3.0	2.5:1	24.00 ± 0.21 a	31.80 ± 2.71 a
3.0	1.25:1	10.80 ± 0.29 d	9.07 ± 0.18 c
6.0	20:1	1.30 ± 0.08 j	13.70 ± 0.08 b
6.0	10:1	14.30 ± 0.22 c	8.73 ± 0.06 cd
6.0	5:1	0.92 ± 0.01 ki	5.63 ± 0.71 fg
6.0	2.5:1	15.50 ± 0.15 c	6.66 ± 0.29 fg
12.0	40:1	11.00 ± 0.21 d	4.35 ± 1.36 g
12.0	20:1	16.30 ± 0.23 b	7.36 ± 0.70 def
12.0	10:1	10.00 ± 0.16 e	4.67 ± 0.58 g
12.0	5:1	8.73 ± 0.07 g	6.54 ± 0.26 efg
24.0	80:1	0.67 ± 0.02 i	4.97 ± 0.12 g
24.0	40:1	0.34 ± 0.02 m	9.73 ± 1.79 c
24.0	20:1	7.00 ± 0.02 h	15.30 ± 0.77 b
24.0	10:1	1.08 ± 0.03 jk	7.72 ± 1.41 cde

注: 同列不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Different lowercase letters in the same column mean significant differences ($P < 0.05$).

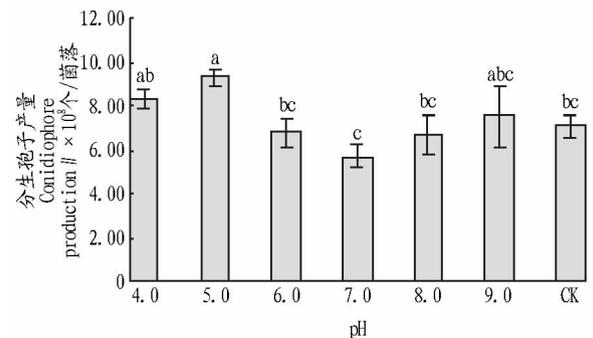
2.5 pH对厚垣孢普可尼亚菌产孢的影响 从图5可以看出,弱碱性条件有利于厚垣孢子的产生。当pH为8.0时,厚垣孢子产量最大,与其他处理差异显著。就产分生孢子而言,当pH为5.0时产孢量较大(图6),与Gao等^[5]报道的结果相似。



注: 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Different letters mean significant differences ($P < 0.05$).

图5 不同pH对厚垣孢普可尼亚菌产厚垣孢子的影响

Fig. 5 Effects of different pH on chlamydospore production of *P. chlamydosporia*

注: 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Different letters mean significant differences ($P < 0.05$).

图6 不同pH对厚垣孢普可尼亚菌产分生孢子的影响

Fig. 6 Effects of different pH on conidiophore production of *P. chlamydosporia*

3 结论与讨论

真菌生长和产孢所需的营养条件不同,适合其营养生长的条件并不一定适合其产孢。两步培养法是指使待测真菌在适宜该真菌生长的培养基中进行营养生长至产孢前,然后将获得的产孢前的营养菌丝体转移至不同营养成分或不同环境条件的新鲜培养基中,进行产孢培养^[4]。笔者采用两步培养法确定了厚垣孢普可尼亚菌 PC021120-152 菌株的最佳产厚垣孢子条件:初始碳源浓度为3.00 g/L,碳氮摩尔比为2.5:1,最佳碳氮源组合为蔗糖/NaNO₃,最佳pH为8.0。

PC021120-152 菌株的最佳产分生孢子条件为:初始碳源浓度为 3.00 g/L,碳氮摩尔比为 2.5:1,最佳碳氮源组合为 D-果糖/NaNO₃,最佳 pH 为 5.0。由此可见,厚垣孢普可尼亚菌 PC021120-152 菌株的最佳产分生孢子和厚垣孢子的培养条件不同,在该生防菌剂的发酵调控中根据需求选择最适合的产孢条件。

培养基的组成和配比合适与否对微生物的生长、繁殖、代谢和产物形成都会产生相当大的影响。影响真菌产孢的因素主要有培养基的营养、pH、湿度、无机盐。培养基的营养成分不能太丰富,碳源、氮源不宜过多,尤其是有机氮源含量要少一些,否则不易形成孢子,而无机盐的用量会影响孢子的颜色和数量^[6]。关于营养、pH、温度、光照、水活度等条件对厚垣孢普可尼亚菌产分生孢子的影响已有报道^[5,7-10],但这些条件对其产厚垣孢子的影响却鲜有报道。厚垣孢子的产生是菌株应对营养缺失或者其他环境压力(如高温、高压、干燥等)的一种方式^[11],使其易在土壤中存活。孢子是真菌杀虫剂的主要成分,能否在人工培养基上产生大量孢子是评价菌株作为是否有潜力的重要标准。液固双相发酵在微生物大批量培养中应用广泛,它是指经液体深层发酵培养出菌丝或孢子后接入固体培养基上产生孢子的方法,此过程与两步培养法相似。Sun 等^[4]研究表明采用两步培养法获得的最佳碳氮源产孢量比连续培养法相应的碳氮源产孢量多。在连续培养中,菌丝营养生长会改变培养基的成分,降低其

营养,无法确定真菌产孢阶段的起始浓度。采用两步培养法确定的真菌产孢营养环境条件对于指导真菌生防菌剂的生产、提高固态发酵的产孢量具有一定的意义。

参考文献

- [1] 肖顺. 根结线虫寄生真菌资源与淡紫拟青霉 PL89 的研究[D]. 福州:福建农林大学,2006;11-12.
- [2] 卢明科,潘沧桑,李舟. 厚垣轮枝孢菌(*Verticillium chlamyosporium*)防治植物线虫研究进展[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2004,32(4):103-106.
- [3] 方中达. 植病研究方法[M]. 3版. 北京:中国农业出版社,1998:50.
- [4] SUN M H,GAO L,LIU X Z,et al. Fungal sporulation in two-stage cultivation[J]. *Mycosystema*,2009,28(1):64-72.
- [5] GAO L,LIU X Z,SUN M H,et al. Use of a novel two-stage cultivation method to determine the effects of environmental factors on the growth and sporulation of several biocontrol fungi[J]. *Mycoscience*,2009,50(4):317-321.
- [6] 曹军卫,马辉文. 微生物工程[M]. 北京:科学出版社,2002:80-90.
- [7] 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.
- [8] MO M H,XU C K,ZHANG K Q. Effect of carbon and nitrogen sources, carbon-to-nitrogen ration, and initial pH on the growth of nematophagous fungus *Pochonia chlamyosporia* in liquid culture[J]. *Mycopathologia*,2005,159:381-387.
- [9] LIU X Z,CHEN S Y. Nutritional requirements of *Pochonia chlamyosporia* and ARF18, fungal parasites of nematode eggs[J]. *Invertebr Pathol*,2003,83:10-15.
- [10] XU L L,LI F,XIE H Y,et al. A novel method for promoting conidial production by a nematophagous fungus, *Pochonia chlamyosporia* AS6.8[J]. *World J Microbiol Biotechnol*,2009,25(11):1989-1994.
- [11] 刘静,李中元,王军娥,等. 丝状真菌产孢机制及其相关基因研究进展[J]. 贵州农业科学,2009,37(4):81-83.
- [12] 孙广玉,李威,蔡敦江,等. 高寒区苜蓿越冬的生理适应性[J]. 东北林业大学学报,2005,23(6):51-53.
- [13] 纪荣花,于磊,鲁为华. 不同苜蓿品种建植当年田间生长发育与根系特征比较[J]. 草原与草坪,2011,31(5):21-26.
- [14] 崔国文. 紫花苜蓿田间越冬期抗寒生理研究[J]. 草地学报,2009,17(2):145-150.
- [15] VIANDS D R. Variability and selection for characters associated with root regeneration capability in alfalfa[J]. *Crop Sci*,1998,28:232-236.
- [16] 马春平,宋丽萍,崔国文. 紫花苜蓿抗寒生理指标的比较研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2006(6):647-648.
- [17] 由继红,杨文杰,李淑云. 不同品种紫花苜蓿抗寒性的研究[J]. 东北师大学报(自然科学版),1995(2):102-105.
- [18] 魏臻武,王德贤,贺连昌. 超氧化物歧化酶在苜蓿抗寒锻炼过程中的作用[J]. 草业科学,2006,23(7):15-18.
- [19] 申晓慧,姜成,李如来,等. 3种紫花苜蓿与草地羊茅草、混播越冬期根系生理变化及抗寒性研究[J]. 草业科学,2016,33(2):268-275.
- [20] 南丽丽,师尚礼,陈建纲,等. 不同根型苜蓿根系对低温胁迫的响应及其抗寒性评价[J]. 中国生态农业学报,2011,19(3):619-625.
- [21] 王运涛,于林清,萨仁. 苜蓿抗寒性研究进展[J]. 草原与草坪,2012,32(3):91-96.
- [22] GERLOFF E S. Soluble protein in alfalfa root as related to cold hardiness[J]. *Plant Physiol*,2007,42:895.
- [23] 南丽丽,师尚礼,朱新强,等. 田间越冬期不同根型苜蓿根系的生理生化特性[J]. 核农学报,2011,25(2):369-374.

(上接第 15 页)

值,且同一品种抗寒性较强的苜蓿单、混播处理间差异也较大。这与 Gerloff^[15] 提出抗寒性强的苜蓿品种 POD 和 CAT 的活性及 2 种新同工酶的合成能力要比抗寒性弱的品种高以及南丽丽等^[6] 报道随着秋冬温度的降低,苜蓿过氧化物酶活性明显增加,有利于提高苜蓿抗寒性的研究结果相一致。

笔者采用隶属函数法对各处理的 MDA、SOD、POD 及 CAT 指标进行了综合评判,得出其抗寒性从强到弱依次为:Wega7F + 无芒雀麦、Wega7F、WL319HQ + 无芒雀麦、WL319HQ、驯鹿 + 无芒雀麦、驯鹿、敖汉 + 无芒雀麦、敖汉。

参考文献

- [1] 夏明,刘亚学,阿拉木斯,等. 低温下苜蓿叶片膜脂脂肪酸组成的研究[J]. 中国草地,2002,24(6):28-37.
- [2] 冯昌军,罗新义,沙伟,等. 低温胁迫对苜蓿品种幼苗 SOD、POD 活性和脯氨酸含量的影响[J]. 草业科学,2005,22(6):29-32.
- [3] 邓雪柯,乔代蓉,李亮,等. 低温胁迫对紫花苜蓿生理特性影响的研究[J]. 四川大学学报(自然科学版),2005,42(1):191-193.
- [4] 张荣华,李拥军,张叶玲. 脯氨酸含量对苜蓿抗寒性影响的研究[J]. 现代化农业,2006(4):17-18.