



响应面法优化爪哇虫草菌的培养条件及其对斜纹夜蛾的毒力和保护酶活性影响

汤永玉, 吴国星, 李冉, 杨燕通, 王思洁, 梁晨, 张曼, 高熹*

云南农业大学植物保护学院, 云南 昆明 650201

汤永玉, 吴国星, 李冉, 杨燕通, 王思洁, 梁晨, 张曼, 高熹. 响应面法优化爪哇虫草菌的培养条件及其对斜纹夜蛾的毒力和保护酶活性影响[J]. 微生物学报, 2023, 63(12): 4555-4573.

TANG Yongyu, WU Guoxing, LI Ran, YANG Yantong, WANG Sijie, LIANG Chen, ZHANG Man, GAO Xi. Response surface methodology-based optimization of culture conditions of *Cordyceps javanica* with effects on virulence and protective enzyme activity of *Spodoptera litura*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(12): 4555-4573.

摘要:【目的】优化爪哇虫草菌 Bd01 的固态发酵培养条件, 测定分生孢子对斜纹夜蛾 3 龄幼虫的毒力, 研究被爪哇虫草菌侵染后寄主体内的保护酶活性变化。【方法】采用单因素试验确定爪哇虫草菌 Bd01 最佳的固态培养基及培养条件, 利用 Box-Behnken 响应面法优化发酵参数, 采用浸渍法测定分生孢子对斜纹夜蛾 3 龄幼虫的毒力, 同时利用分光光度计法测定斜纹夜蛾 3 龄幼虫体内酶活性变化。【结果】以产孢量为指标, 通过响应曲面法优化的爪哇虫草菌 Bd01 最佳产孢条件为: 培养基营养成分含量为 30.24 g/L, pH 值为 7.55, 光照时长为 12.06 h, 在该条件下, 培养基的产孢量为 2.78×10^8 孢子/mL。浓度为 1×10^8 孢子/mL 的爪哇虫草菌孢子液对斜纹夜蛾 3 龄幼虫具有一定毒力, 处理 7 d 时致死中浓度(LT_{50})为 3.11 d, 致死中时(LC_{50})为 4.68×10^5 孢子/mL, 校正死亡率为 88.68%。处理后未死亡的斜纹夜蛾幼虫体内保护酶活性与对照组相比发生显著变化。【结论】优化后的培养基能够显著增加爪哇虫草菌的产孢量; 爪哇虫草菌对斜纹夜蛾幼虫的致死率和致死效率与浓度呈正相关; 斜纹夜蛾幼虫体内的保护酶可能在抵抗爪哇虫草菌侵染的过程中起关键作用。

关键词: 爪哇虫草菌; 斜纹夜蛾幼虫; 培养条件; 毒力; 保护酶活性

资助项目: 四川省区域创新合作项目(2021YFQ0022); 云南省中青年学术和技术带头人后备人才项目(202205AC160077); 云南农业大学第十五届科技创新创业基金(2022ZKY587)

This work was supported by the Sichuan Regional Innovation Cooperation Project (2021YFQ0022), the Reserve Talents Project for Young and Middle-aged Academic and Technical Leaders in Yunnan Province (202205AC160077), and the 15th Science and Technology Innovation and Entrepreneurship Fund Project of Yunnan Agricultural University (2022ZKY587).

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

Received: 2023-04-05; Accepted: 2023-08-22; Published online: 2023-08-29

Response surface methodology-based optimization of culture conditions of *Cordyceps javanica* with effects on virulence and protective enzyme activity of *Spodoptera litura*

TANG Yongyu, WU Guoxing, LI Ran, YANG Yantong, WANG Sijie, LIANG Chen, ZHANG Man, GAO Xi*

College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, Yunnan, China

Abstract: [Objective] To optimize the solid-state fermentation conditions of *Cordyceps javanica* Bd01, determine the virulence of the conidia to the 3rd-instar larvae of *Spodoptera litura*, and study the changes of protective enzyme activities in *S. litura* after infection by *C. javanica*. [Methods] The optimum solid-state medium and culture conditions of *C. javanica* Bd01 were first determined by single factor experiments and then optimized by Box-Behnken response surface method. The virulence of the conidia to the 3rd-instar larvae of *S. litura* was determined by the immersion method, and the changes of enzyme activities in the larvae were determined by a spectrophotometer. [Results] With the spore yield as an indicator, the sporulation conditions of *C. javanica* were optimized as medium nutrient content of 30.24 g/L, pH 7.55, and light duration of 12.06 h. Under these conditions, the spore yield reached 2.78×10^8 spores/mL. The conidial suspension of *C. javanica* at the concentration of 1×10^8 spores/mL was virulent to the 3rd-instar larvae of *S. litura*. After seven days of treatment, the LT_{50} , LC_{50} , and corrected mortality rate were 3.11 d, 4.68×10^5 spores/mL, and 88.68%, respectively. The activities of protective enzymes in the survived larvae of *S. litura* after treatment were significantly different from those in the control group. [Conclusion] The optimized culture medium can significantly increase the spore production of *C. javanica*. The lethal rate and lethal efficiency of *C. javanica* to *S. litura* larvae were dependent on the concentration. The protective enzymes in *S. litura* larvae may play a key role in the defense against the infection of *C. javanica*.

Keywords: *Cordyceps javanica*; *Spodoptera litura* larvae; culture conditions; virulence; protective enzyme activity

斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*) 隶属鳞翅目 (*Lepidoptera*) 夜蛾科 (*Noctuidae*), 在亚洲、非洲和欧洲均有分布, 是一种世界性广泛分布的重要经济害虫^[1]。该虫寄主植物种类包含裸子植物、双子叶植物、单子叶植物和蕨类植物^[2]。斜纹夜蛾一年能发生多个世代, 且存在世代重叠, 能在短时间内对种植作物造成重大经济损失^[3]。迄今为止, 对斜纹夜蛾的防治仍以化学防治为主, 但是斜纹夜蛾已经对有机氯农药^[4]、有

机磷及氨基甲酸酯类农药^[5]和拟除虫菊酯农药^[6]三大类农药产生了抗药性。采用虫生真菌防治害虫具有容易分离培养、能持续控制害虫、安全高效、无污染和不易产生抗性等优点^[7]。因此, 利用昆虫病原真菌来防治斜纹夜蛾已成为国内外专家学者研究的热点。Jamunarani 等^[8]的研究报道显示, 球孢白僵菌 UHSB-END1 能够定殖在番茄叶片中, 生物测定结果显示球孢白僵菌无论是直接作用于斜纹夜蛾, 还是通过

定殖于番茄叶片再作用于斜纹夜蛾, 均对斜纹夜蛾 2 龄幼虫有较好的致死效果。Batoool 等^[9]采用饲喂法和浸渍法测定杀虫剂与球孢白僵菌和绿僵菌联合使用对斜纹夜蛾 3 龄幼虫的致死效果, 发现氯虫苯甲酰胺处理组的幼虫死亡率最高, 致死中浓度(LC₅₀)和致死中时(LT₅₀)最小, 其次是虱螨脲, 而甲维盐处理组的幼虫死亡率最低, 绿僵菌对斜纹夜蛾的致病性显著高于球孢白僵菌。Fitriana 等^[10]从玉米田土壤中分离出 4 株对斜纹夜蛾有不同致病效果的病原真菌, ITS 序列鉴定结果显示, 其中一株为球孢白僵菌(NKPT), 另外 3 株为曲霉菌(SKHJ、SDHJ 和 RAHJ)。胥志民^[11]采用浸渍法测定莱氏绿僵菌(*Metarhizium rileyi*) Nr.5772 产生毒素对斜纹夜蛾的毒力, 结果表明菌株毒素对斜纹夜蛾幼虫具有明显致死效果。由此可见, 昆虫病原真菌在未来生物防治应用中具有较好的前景。

当有外界刺激时, 昆虫启动非特异性应激反应, 激活主要由超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和过氧化物酶(oxidase, POD)组成的抗氧化防御系统。这些酶的主要功能是清除体内自由基, 抵御破坏细胞膜和细胞器的有害物质, 帮助机体适应不断变化的环境条件或抵御外源物质的干扰^[12-13]。

爪哇虫草菌(*Cordyceps javanica*, 原为 *Isaria javanica*), 属真菌门、孢纲、丝孢目、丝孢科、棒孢霉属。致病方式是通过菌丝侵染寄主的表皮, 在保护酶和解毒酶等一系列酶的作用下破坏寄主被侵入位置附近表皮的结构, 当菌丝穿过表皮进入寄主血腔后, 通过摄取寄主昆虫体内的营养物质来维持自身的生长繁殖, 一段时间后, 寄主昆虫的虫体感菌后死亡, 虫体表面布满菌丝, 同时菌丝产生的分生孢子经过新一轮的生长繁殖继续进行侵染^[14-15]。国内外已有

学者研究爪哇虫草菌对半翅目和鞘翅目等害虫的防治, Ou 等^[16]从柑橘木虱(*Diaphorina citri* Kuwayama)成虫尸体中分离出一株爪哇虫草菌, 对柑橘木虱若虫和成虫均有较好致病性。Wu 等^[17]从野外自然甘薯白粉虱(*Sweetpotato whitefly*)中分离出爪哇虫草菌株 wf GA17, 能够致死甘薯白粉虱。刘全俊等^[18]从咖啡灭字脊虎天牛(*Xylotrechus quadripes*)幼虫中分离出爪哇虫草菌, 该菌对咖啡灭字脊虎天牛幼虫的 LC₅₀ 为 4.56×10⁵ 孢子/mL。众多学者的研究结果明确了爪哇虫草菌在半翅目和鞘翅目害虫方面发挥着不可替代的作用, 而关于爪哇虫草菌对鳞翅目害虫的致病性方面未有学者进行探究, 深入研究该菌对鳞翅目害虫的致病性, 将为菌株的杀虫广谱性提供更加科学合理的理论依据与技术支持。

为了探究爪哇虫草菌的最适培养条件, 了解其对鳞翅目害虫斜纹夜蛾的生防效果和侵染寄主后体内保护酶活性的变化, 本研究通过单因素筛选出最适培养基和培养条件, 响应面验证和优化其培养条件, 测定该菌株对斜纹夜蛾 3 龄幼虫的毒力以及侵染后斜纹夜蛾体内 CAT、POD、SOD 活性。研究结果可以为爪哇虫草菌对斜纹夜蛾的防治和昆虫对病原菌侵染的防御机制提供理论参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

斜纹夜蛾采自云南省昆明市石林(E103°28'89", N24°77'82", 海拔 1 686 m)烟田, 于云南农业大学昆虫饲养室[T=(28±1) °C, RH=75%±5%, L:D=14 h:10 h]人工饲养, 已饲养 3 代以上, 选取 3 龄幼虫作为实验试虫。

1.2 供试菌株

供试爪哇虫草菌 Bd01 (保藏号: CGMCC

No.23078)分离自罹病咖啡灭字脊虎天牛幼虫僵虫, 僵虫采自普洱市思茅区南岛河咖啡种植园。保存于云南农业大学昆虫毒理学实验室(-80 °C)。

1.3 培养基

本研究所采用的马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)基础培养基和改良培养基 PDA1-4 的成分见表 1。

1.4 主要试剂和仪器

主要试剂: 琼脂, 北京索莱宝科技有限公司; 酵母浸粉, 北京生物科技有限公司; 蔗糖、葡萄糖、淀粉、乳糖和麦芽糖等, 天津市大茂化学试剂厂; 麦麸、黄豆粉等, 购自市场; 过氧化氢酶、过氧化物酶和超氧化物歧化酶试剂盒, 北京盒子生工科技有限公司。

主要仪器: 体式显微镜(Motic), 宁波舜宇仪器有限公司; 智能型人工气候箱, 宁波东南仪器有限公司; 超低温冰箱(-80 °C)、高速冷冻离心机, 赛多利斯科学仪器有限公司。

1.5 响应面优化爪哇虫草菌 Bd01 菌株的培养条件

1.5.1 不同培养基对菌株生长的影响

配制 PDA、PDA1、PDA2、PDA3 和 PDA4 五种固体培养基^[19], pH 值均为自然, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min 后待用。在超净工作台中用灭菌打

孔器(5 mm)打菌饼, 将打好的菌饼分别接在 5 种培养基(90 mm)中央。放入 28 °C、RH 为 75%±5% 的无光照培养箱培养, 采用十字交叉法每 2 d 测量 1 次菌落直径, 共测量到第 10 天。继续培养到第 14 天, 测定菌株产孢量。用灭菌打孔器取 3 块菌饼(距离培养皿中心相同位置)于装有 1 mL 0.1%吐温-80 的无菌水中, 充分摇匀, 用血球计数板测定孢子数, 计算产孢量, 筛选出最适合生长、产孢的培养基。每个处理重复 3 次。

1.5.2 不同 pH 值对菌株生长的影响

将 PDA 培养基的 pH 值分别配制为 9.5、8.5、7.5、6.5、5.5 五个不同处理, 放入 28 °C、RH 为 75%±5% 的无光照培养箱培养, 采用十字交叉法每 2 d 测量 1 次菌落直径, 共测量到第 10 天。继续培养到第 14 天, 测定菌株产孢量。

1.5.3 不同碳源对菌株生长的影响

以等量的乳糖、麦芽糖、蔗糖、可溶性淀粉 4 种碳源, 替换 PDA 固体培养基中的葡萄糖。放入 28 °C、RH 为 75%±5% 的无光照培养箱培养, 采用十字交叉法每 2 d 测量 1 次菌落直径, 共测量到第 10 天。继续培养到第 14 天, 测定菌株产孢量。

1.5.4 不同光照对菌株生长的影响

在超净工作台中将菌株接种到 PDA 固体培养基上, 置于光照时间分别为 0、6、12、18、

表 1 不同的培养基及其营养成分

Table 1 Media and their nutrient composition used in this study

Culture medium	Ingredient
PDA basal medium	200 g peeled potato, boiled in tap water for 30 min, filtered with gauze to obtain potato water, then added with water to 1 000 mL, and then added with 20 g glucose and 15–20 g agar, with natural pH of 1×10^5 Pa
Improved medium PDA1	Adding carbon source and nitrogen source: 2 g of soluble starch, sucrose, wheat bran, soybean powder, and yeast powder, with a total of 10 g, with a natural pH of 1×10^5 Pa
Improved medium PDA2	Adding carbon source and nitrogen source: soluble starch, sucrose, wheat bran, soybean powder, and yeast powder 4 g each, totaling 20 g, with natural pH of 1×10^5 Pa
Improved medium PDA3	Adding carbon source and nitrogen source: 6 g of soluble starch, 6 g of sucrose, 6 g of wheat bran, 6 g of soybean powder, and 30 g of yeast powder, with natural pH of 1×10^5 Pa
Improved medium PDA4	Adding carbon source and nitrogen source: 8 g of soluble starch, 8 g of sucrose, 8 g of wheat bran, 8 g of soybean powder, and 40 g of yeast powder, with natural pH of 1×10^5 Pa

24 h 的恒温培养箱 28 °C 培养, RH 为 75%±5%, 采用十字交叉法每 2 d 测量 1 次菌落直径, 共测量到第 10 天。继续培养到第 14 天, 测定菌株产孢量。

1.5.5 响应面分析及验证实验

基于单因素筛选的培养基营养成分含量(A)、pH 值(B)以及光照时长(C)实验结果, 按照 Box-Behnken 中心组合设计建立三因素三水平数学模型, 以产孢量为响应值, 设置因素与水平编码(表 2)。以 Design-Expert 8.0 的响应曲面法^[19]分析得出 1 个优化条件, 重复以上培养基的制备和实验方法, 重复 3 次, 验证实验结果。

1.6 爪哇虫草菌 Bd01 菌株对斜纹夜蛾 3 龄幼虫的毒力测定

1.6.1 菌株孢子悬浮液配制

将菌株纯化接种于优化后的培养基平板上, 在 28 °C 恒温培养箱中培养 14 d, 用 0.1% 的吐温-80 无菌水从纯化培养 14 d 的培养皿上洗出孢子粉, 经磁力搅拌器搅拌均匀形成稳定的孢子悬浮液后, 用无菌纱布过滤除去杂物和培养基残留, 显微镜下使用血球计数板计数, 配成 1×10⁸ 孢子/mL 的孢子悬浮液待用。

1.6.2 菌株对斜纹夜蛾 3 龄幼虫的毒力测定

采用浸渍法^[20], 用 0.1% 吐温-80 溶液将 Bd01 菌株孢子粉配成 4 种浓度的孢子悬浮液, 分别为: 1×10⁵、1×10⁶、1×10⁷ 孢子/mL 和 1×10⁸ 孢子/mL, 用灭菌镊子夹取斜纹夜蛾 3 龄幼虫浸于配制好的各浓度孢子悬浮液 10–15 s, 取出放在滤纸上爬行风干后放于饲养盒。每个

处理 20 头 3 龄幼虫, 重复 3 次, 以 0.1% 吐温-80 无菌水浸渍处理的幼虫为对照组。将饲养盒置于人工气候箱(28 °C, RH 为 75%±5%, L:D=14 h:10 h)饲养, 每天同一时间更换食物并观察, 连续观察 8 d, 记录死亡数。用小毛笔轻轻触摸虫体, 以幼虫无力且不能正常爬行或虫体长出菌丝作为死亡记录。采用机率值分析法计算毒力回归方程、致死中浓度(LC₅₀)和致死中时(LT₅₀), 并对各处理的累计死亡率进行方差检验, 比较各不同处理间的差异显著性。

1.7 爪哇虫草菌 Bd01 菌株对斜纹夜蛾幼虫保护酶活性的影响

1.7.1 酶液制备

取饥饿处理 12 h 大小基本一致的 3 龄斜纹夜蛾幼虫于 1×10⁸ 孢子/mL 爪哇虫草菌孢子悬浮液中浸渍 10–15 s, 置于 28 °C、RH 为 75%±5% 的恒温养虫室, 分别培养 12、24、36、48、60 和 72 h。每 6 头试虫为 1 个重复, 每个处理 3 个重复。分别取各时段处理的斜纹夜蛾幼虫于液氮速冻后冻存至-80 °C 冰箱, 用于后续酶活性测定。参照试剂盒方法, 动物组织质量(g)与提取液体积(mL)按 1:(5–10)的比例处理样品, 冰浴匀浆。4 °C、8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液置于冰上待测。

1.7.2 过氧化氢酶活性的测定

紫外分光光度计预热 30 min 以上, 调节波长至 240 nm, 蒸馏水调零。具体操作步骤见 CAT 活性检测试剂盒说明书。

1.7.3 过氧化物酶活性的测定

分光光度计预热 30 min 以上, 调节波长至 470 nm, 蒸馏水调零。具体操作步骤见 POD 活性检测试剂盒说明书。

1.7.4 超氧化物歧化酶活性的测定

分光光度计预热 30 min 以上, 调节波长至 560 nm, 蒸馏水调零。具体操作步骤见 SOD 活性检测试剂盒说明书。

表 2 因素与水平编码

Table 2 Coding of factors and levels

Level	A: Nutrient content of medium (g)	B: pH value	C: Light (h)
-1	20	5.5	6
0	30	6.5	12
1	40	7.5	18

1.8 数据处理

(1) 孢子浓度计算公式(25×16型): 孢子个数/mL=5个中方格中的总菌数/5×25×10⁴×菌液稀释倍数

(2) 死亡率(%)=死虫数/供试虫数×100

(3) 校正死亡率(%)=(处理组死亡率-对照组死亡率)/(1-对照组死亡率)×100

使用 Excel 2016 进行数据整理, GraphPad Prism 8 和 Excel 2016 绘图, SPSS 20.0 软件的 Probit 模型拟合毒力回归方程计算 LT_{50} 和 LC_{50} , 采用 Duncan 氏新复极差比较法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 响应面优化爪哇虫草菌 Bd01 菌株的培养条件

2.1.1 不同培养基营养成分含量对 Bd01 营养生长及产孢量的影响

不同培养基对爪哇虫草菌 Bd01 营养生长

的影响如图 1 所示。培养 2 d, 菌株在 PDA 培养基(营养成分含量 0 g/L)上的菌落直径显著小于其他 4 种改良培养基(营养成分含量 10–40 g/L), 生长速度较慢。培养 10 d 后, 在 PDA3 (营养成分含量 30 g/L)培养基上培养的菌落生长速度最快, 菌落直径最大, 为 70.39 mm; 其余依次为 PDA4>PDA2>PDA1>PDA。

如图 2 所示, 爪哇虫草菌 Bd01 在 5 种培养基上生长 14 d 后, PDA3 培养基培养出的菌株孢子浓度显著大于其他 4 种培养基所培养出菌株的孢子浓度, 为 8.83×10^7 孢子/mL。当培养基营养成分含量在 10–30 g/L 之间时, 产孢量随着营养成分含量增加而增加, 当营养成分含量为 30 g/L 时, 菌株孢子浓度最大, 显著高于其他培养基。当营养成分含量为 40 g/L 时, 菌株孢子浓度变小, 产孢量下降, 为 4.30×10^7 孢子/mL。从培养结果来看, PDA3 培养的菌株菌落生长得最好, 菌落面积较大, 菌落紧密, 菌丝厚实, 且产孢量最大, 所以认为 PDA3 培养基最适合

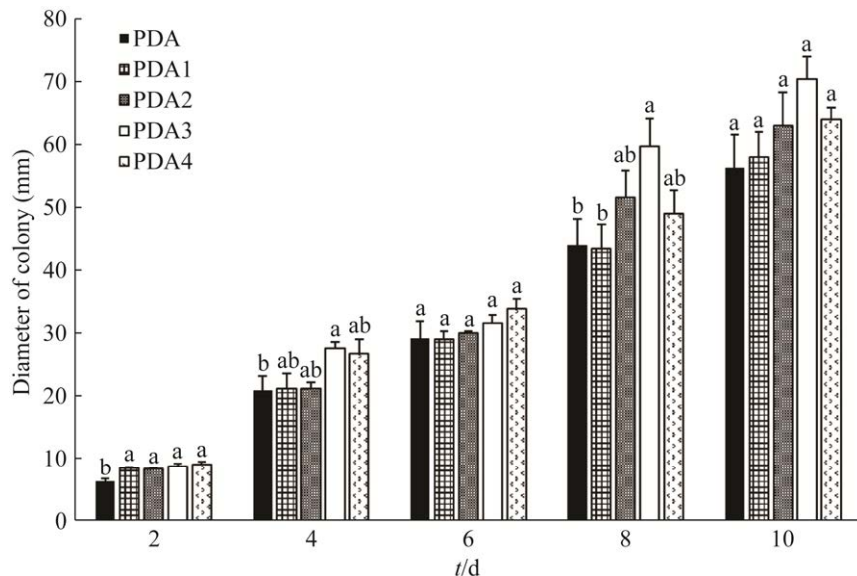


图 1 不同培养基对 Bd01 营养生长的影响

Figure 1 Effects of different media on vegetative growth of Bd01. The data in the figure are the average value±standard error; Different lowercase letters on the bar chart at the same time indicate significant differences among different media ($P<0.05$). PDA: Potato dextrose agar; PDA1–PDA4: Improve potato dextrose agar base medium.

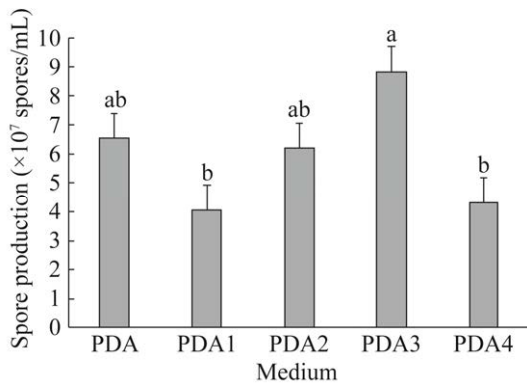


图 2 不同培养基对 Bd01 产孢量的影响

Figure 2 Effects of different media on spore production of Bd01. The data in the figure are the average value \pm standard error. Different lowercase letters on the bar chart at the same time indicate significant differences among different media ($P<0.05$). PDA: Potato dextrose agar; PDA1–PDA4: Improve potato dextrose agar base medium.

菌株生长。因此，碳源、pH 和光照条件对菌株的生长试验均采用 PDA3。

2.1.2 不同碳源对 Bd01 菌株营养生长及产孢量的影响

不同碳源对 Bd01 菌丝生长的影响如图 3

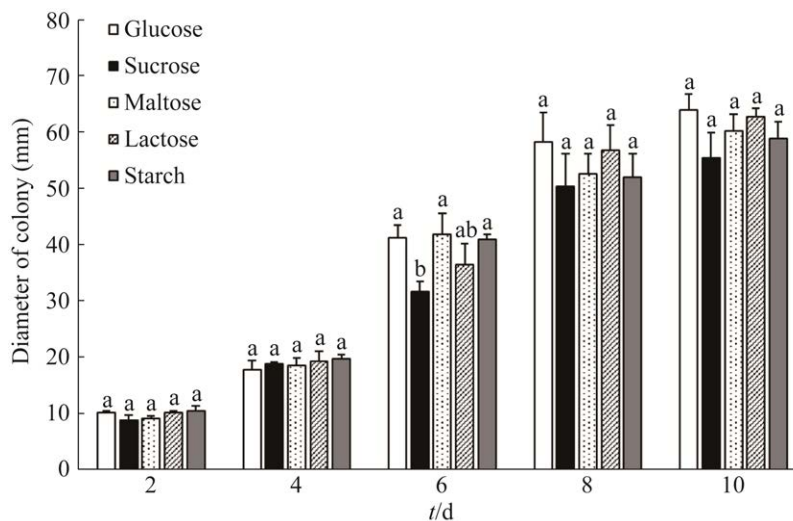


图 3 不同碳源对 Bd01 营养生长的影响

Figure 3 Effects of different carbon sources on vegetative growth of Bd01. The data in the figure are the average value \pm standard error. Different lowercase letters on the bar chart at the same time indicate significant differences among different media ($P<0.05$).

所示，可知随着培养时间的延长，菌丝逐渐生长，菌落逐渐变大。培养 6 d 后，菌株在淀粉、乳糖、葡萄糖和麦芽糖为碳源的培养基上的生长效果显著大于以蔗糖为碳源的培养基上的生长效果。培养 10 d 后，以葡萄糖为碳源的培养基菌落直径最大，为 63.95 mm。以蔗糖为碳源的培养基菌落直径最小，菌落直径为 55.50 mm。

由图 4 可知，经培养 14 d 后，不同碳源的培养基产孢量大小存在显著性差异。当以淀粉为碳源时，菌株产孢量最大，为 3.73×10^8 孢子/mL；当以葡萄糖为碳源时，菌株产孢量仅次于以淀粉为碳源，为 2.83×10^8 孢子/mL；其次是乳糖 2.25×10^8 孢子/mL、麦芽糖 2.17×10^8 孢子/mL；以蔗糖为碳源的培养基产孢量最小，为 1.53×10^8 孢子/mL。综合菌株菌丝生长情况和产孢量，选择葡萄糖为后续培养的碳源。经培养 14 d 后，不同碳源的培养基孢子浓度大小存在显著性差异。当以淀粉为碳源时，菌株孢子浓度最大，为 3.73×10^8 孢子/mL；当以葡萄糖为碳源时，菌株孢子浓度仅次于以淀粉为碳源，为

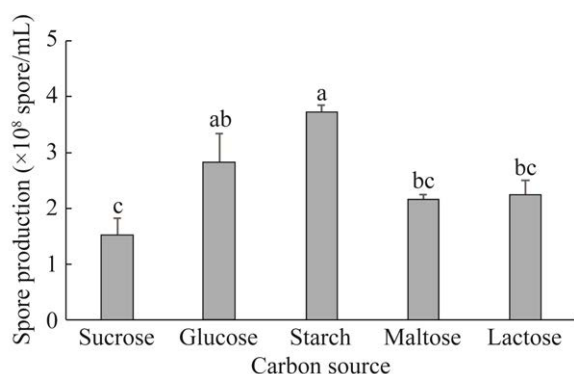


图4 不同碳源对Bd01产孢量的影响

Figure 4 Effects of different carbon sources on sporulation of Bd01. The data in the figure are the average value \pm standard error. Different lowercase letters on the bar chart at the same time indicate significant differences among different media ($P<0.05$).

2.83×10^8 孢子/mL; 其次是乳糖 2.25×10^8 孢子/mL、麦芽糖 2.17×10^8 孢子/mL; 以蔗糖为碳源的培养基孢子浓度最小, 为 1.53×10^8 孢子/mL。综合菌株菌丝生长情况和产孢量, 选择葡萄糖为

后续培养的碳源。

2.1.3 不同 pH 对 Bd01 菌株营养生长及产孢量的影响

不同 pH 对 Bd01 菌株菌丝生长的影响如图 5 所示, 培养 10 d 后, 菌株在 pH 为 5.5–9.5 的培养基中均能生长, 在 pH 为 7.5 的培养基中菌落直径最大, 且显著大于其他 pH 条件下培养基的菌落直径, 为 70.83 mm。pH 为 6.5 时, 菌落直径为 58.48 mm, 大小仅次于 pH 为 7.5 时; pH 5.5 条件下, 菌落直径最小, 为 47.89 mm, 且显著小于其他 pH 条件下的菌落直径。整体结果说明, pH 过酸过碱都不利于菌丝生长, 在培养过程中要控制菌株生长的酸碱环境。

如图 6 所示, 培养 14 d 后, pH 为 7.5 和 8.5 的培养基其孢子浓度较大, 分别为 2.70×10^8 孢子/mL 和 2.68×10^8 孢子/mL, 二者产孢量显著高于 pH 为 5.5、6.5 和 9.5 条件下的产孢量。在 pH 6.5–9.5 范围内产孢量呈现先增加后减少的趋势, 最低为 pH 9.5 条件下的产孢量 1.78×10^8 孢子/mL。

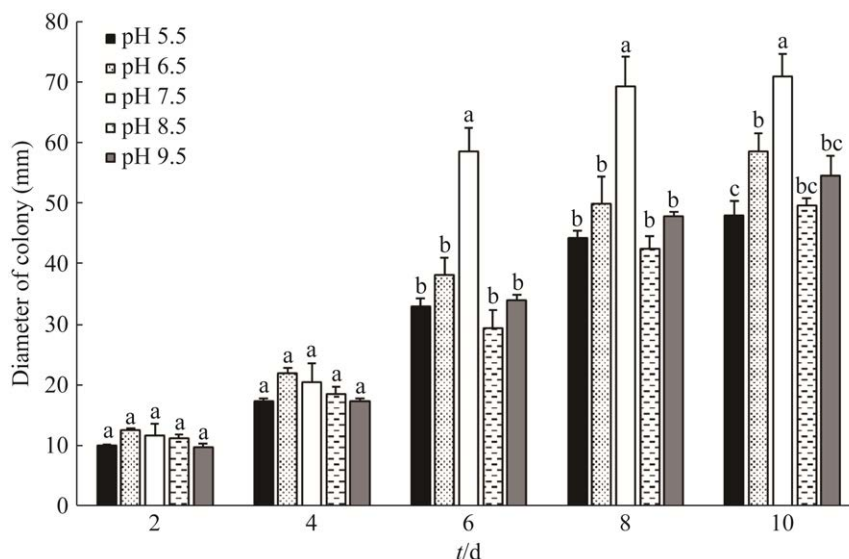


图5 不同 pH 对 Bd01 营养生长的影响

Figure 5 Effects of different pH on vegetative growth of Bd01. The data in the figure are the average value \pm standard error. Different lowercase letters on the bar chart at the same time indicate significant differences among different media ($P<0.05$).

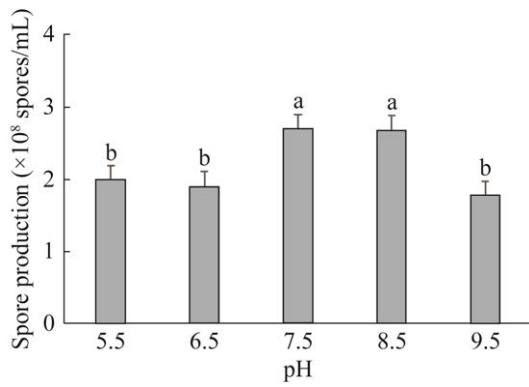


图 6 不同 pH 对 Bd01 产孢量的影响

Figure 6 Effect of different pH on spore production of Bd01. The data in the figure are the average value \pm standard error. Different lowercase letters on the bar chart at the same time indicate significant differences among different media ($P < 0.05$).

因 pH 7.5 条件下产孢量最大, 所以后续培养选择 pH 7.5 较为适宜。

2.1.4 不同光照时长对 Bd01 菌株营养生长及产孢量的影响

光照对 Bd01 菌株菌丝生长的影响如图 7 所

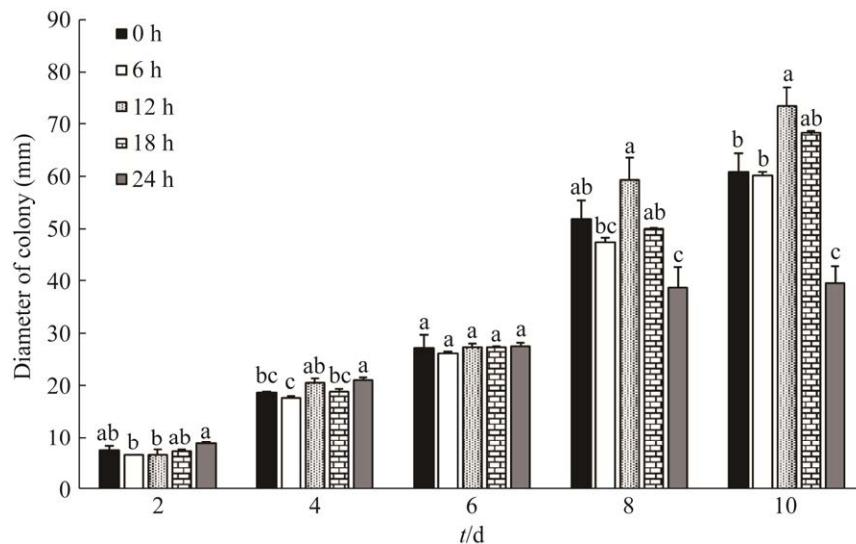


图 7 不同光照时长对 Bd01 营养生长的影响

Figure 7 Effects of different light duration on vegetative growth of Bd01. The data in the figure are the average value \pm standard error. Different lowercase letters on the bar chart at the same time indicate significant differences among different media ($P < 0.05$).

示, 培养初期光照时长为 24 h 的菌落直径显著大于 6 h 和 12 h 的菌落直径, 培养 10 d 后, 光照时长为 12 h 的培养基菌丝生长得最快, 菌落直径最大, 达 73.54 mm; 光照时长为 18 h 的条件下菌丝生长速度其次, 菌落直径达 68.33 mm; 菌株在 2 个条件下生长的菌落直径均显著大于光照时长为 0、6、24 h 条件下的菌落生长直径。当光照时长达到 24 h, 菌落的生长直径最小, 为 39.60 mm。

如图 8 所示, 培养 14 d 后, 菌株的产孢量并不是随着光照时长的增加而增加, 在 0–24 h 光照条件下, 菌株产孢量整体呈现先增加后减少的趋势。当光照时长为 12 h 时, 菌株产孢量最大, 达 1.15×10^8 孢子/mL, 显著高于其他光照条件下的产孢量。当光照为 24 h 时, 菌株产孢量最小, 为 4.22×10^7 孢子/mL, 显著低于其他光照条件下的产孢量。整体结果说明光照时间过长或无光照均不利于菌株生长, 所以光照时长 12 h 为菌株的最适光照时长。

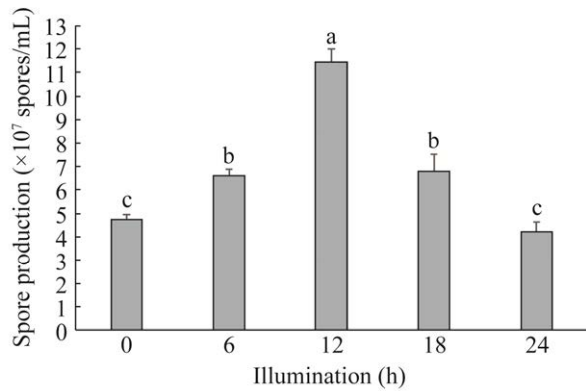


图8 不同光照时长对 Bd01 产孢量的影响

Figure 8 Effect of different light duration on spore production of Bd01. The data in the figure are the average value \pm standard error. Different lowercase letters on the bar chart at the same time indicate significant differences among different media ($P < 0.05$).

2.2 Box-Behnken 响应面实验设计及分析结果

2.2.1 响应面实验设计分析

响应面实验设计结果如表 3 所示，用 Design-Expert 8.0 软件对表中爪哇虫草菌 Bd01 产孢量(Y)以及 3 个因素进行统计分析，得到各单因素的显著性，结果如表 3 所示，并得到了爪哇虫草 Bd01 产孢量(Y)与自变量 A (培养基营养成分含量)、自变量 B (pH 值)及自变量 C (光照时长)的多元二次回归方程如下：

$$Y = 2.78 \times 10^8 + 0.026 \times 10^8 A + 0.046 \times 10^8 B + 0.01 \times 10^8 C + 0.032 \times 10^8 AB - 0.09 \times 10^8 AC + 0.07 \times 10^8 BC - 0.55 \times 10^8 A^2 - 0.52 \times 10^8 B^2 - 0.60 \times 10^8 C^2 \quad (R^2 = 0.9129)$$

根据表 4 响应面实验方差分析结果可知，方程模型的 $P < 0.01$, $R^2 = 0.9129$, 表明该方程的模型极显著，具有较高的可信度高，方程能够很好地拟合所得实验结果。失拟项 $P = 0.3877 > 0.05$, 差异不显著，说明该回归模型的预测值与实测值有较好的拟合水平，该模型适用于对爪哇虫草菌 Bd01 产孢条件的优化分析和结果预测。由方差分析可以看出，一次项培养基营养成分含

表3 Box-Behnken 响应面实验设计结果

Table 3 Box-Behnken response surface experimental design results

Test No.	A: Media of nutrient components (g)	B: pH values	C: Light (h)	Y: Spore yields ($\times 10^8$ spores/mL)
1	-1	1	0	1.63
2	0	1	1	1.62
3	-1	0	-1	1.44
4	0	0	0	3.14
5	0	0	0	2.76
6	1	-1	0	1.71
7	0	1	-1	1.74
8	0	-1	-1	1.83
9	1	0	-1	1.51
10	1	0	1	1.63
11	1	1	0	1.91
12	0	-1	1	1.43
13	0	0	0	2.50
14	0	0	0	2.69
15	-1	-1	0	1.56
16	0	0	0	2.81
17	-1	0	1	1.92

量 A 和二次项 pH 值 B^2 、光照时长 C^2 的 P 值均小于 0.01, 达到了极显著水平, 说明实验所采用的自变量对菌株产孢量的影响较大。

2.2.2 各因素的响应曲面及等高线分析

模型的响应面曲面和等高线图结果如图 9-11 所示，各图显示培养基营养成分含量、pH、光照时长中任意 2 个变量交互作用对爪哇虫草菌 Bd01 产孢量的影响。从响应面分析图可以直观看出，两两变量交互作用的强弱主要由响应面曲线图的形状体现出来，响应面曲线图形坡度越陡，等高线图形越接近椭圆形，表明两两变量交互作用越显著；反之则说明交互作用不显著。3 个变量两两之间的交互作用对爪哇虫草菌 Bd01 产孢量有影响，开始随着两因素的增加而增加，当产孢量达到最大值后，逐渐减小。

表 4 Box-Behnken 响应面实验方差分析

Table 4 Variance analysis of Box-Behnken response surface test

Source	Square sum	df	Mean square	F	Pr>F	Significant
A	4.51	9	0.5	8.15	0.005 7	**
B	0.005 513	1	0.005 513	0.09	0.773 4	
C	0.017	1	0.017	0.28	0.614 2	
AB	0.000 8	1	0.000 8	0.01	0.912 4	
AC	0.004 225	1	0.004 225	0.07	0.800 8	
BC	0.032	1	0.032	0.53	0.491 6	
A ²	0.02	1	0.02	0.32	0.590 1	
B ²	1.29	1	1.29	20.99	0.002 5	**
C ²	1.16	1	1.16	18.78	0.003 4	**
Model	1.52	1	1.52	24.74	0.001 6	**
Residual	0.43	7	0.062			
Lack of fit	0.21	3	0.071	1.31	0.387 7	
Pure error	0.22	4	0.054			
Cor total	4.94	16	0.5	8.15	0.005 7	

** : Extremely significant level ($P<0.01$); * : Significance level ($P<0.05$).

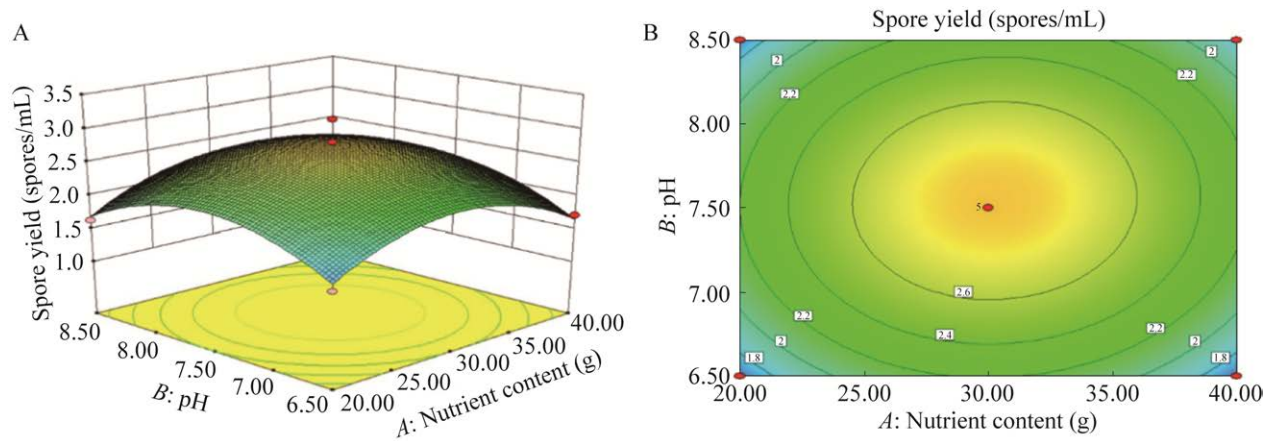


图 9 营养成分含量和 pH 对 Bd01 产孢量影响的响应面(A)和等高线图(B)

Figure 9 Response surface (A) and contour map (B) of the effects of nutrient content and pH on spore production of Bd01.

图 9 为培养基营养成分含量和 pH 及其交互作用对爪哇虫草菌 Bd01 产孢量的影响。由图可知，培养基营养成分含量和 pH 交互作用响应曲面图(A)的坡度陡，等高线图(B)呈现椭圆形，当培养基营养成分含量在 20–30 g，pH 在 6.5–7.5 之间时，爪哇虫草菌产孢量逐渐增大达到极值；当培养基营养成分含量在 30–40 g，pH

在 7.5–8.5 之间时，爪哇虫草菌产孢量从最大值开始逐渐减小。

图 10 为培养基营养成分含量和光照及其交互作用对爪哇虫草 Bd01 产孢量的影响。通过此图可以看出，培养基营养成分含量和光照时长交互作用响应曲面图(A)的坡度陡，等高线图(B)呈现椭圆形，说明培养基营养成分含量对爪哇

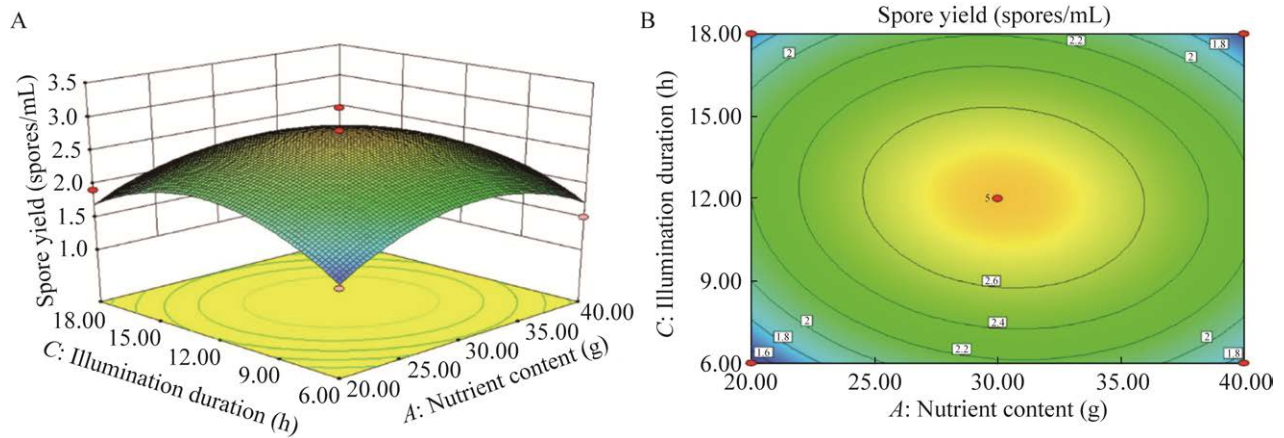


图 10 营养成分含量和光照时长对 *Bd01* 产孢量影响的响应面(A)和等高线(B)

Figure 10 Response surface (A) and contour line (B) of the effects of nutrient content and light duration on spore production of *Bd01*.

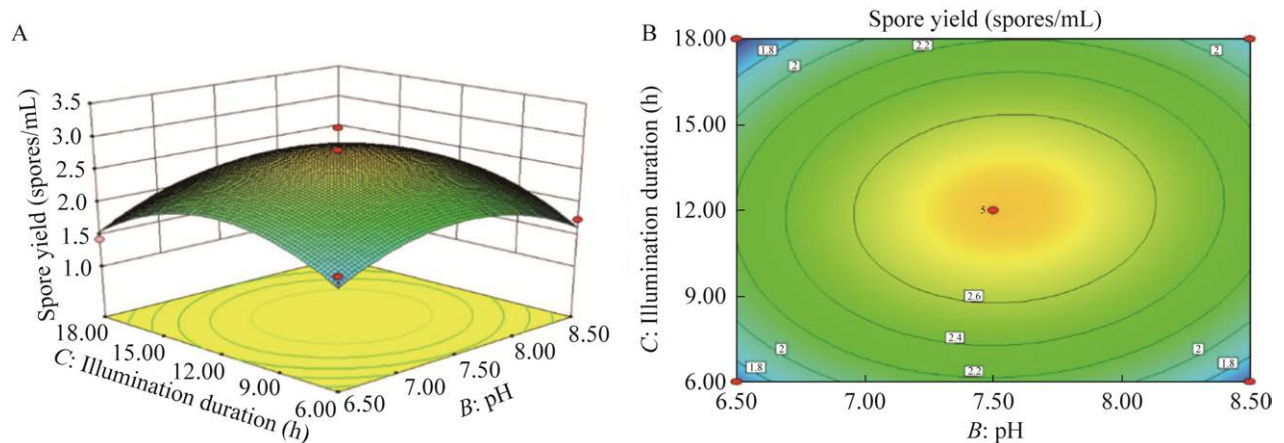


图 11 pH 和光照时长对 *Bd01* 产孢量影响的响应面(A)和等高线(B)

Figure 11 Response surface (A) and contour line (B) of the effects of pH and light duration on spore production of *Bd01*.

虫草菌产孢量的影响依旧较为明显。当营养成分含量在 20–30 g，光照时长在 6–12 h 之间时，爪哇虫草菌产孢量逐渐增大达到极值；当培养基营养成分含量在 30–40 g，光照时长在 12–18 h 之间时，爪哇虫草菌产孢量逐渐减小。

图 11 展示了 pH 和光照时长及其交互作用对爪哇虫草菌 *Bd01* 产孢量的影响。从图中可以看出，pH 和光照时长交互作用响应曲面图(A)的坡度陡，等高线图(B)呈现椭圆形，说明 pH

和光照时长二者对爪哇虫草菌的产孢量影响都比较显著。当 pH 在 6.5–7.5，光照时长在 6–12 h 之间时，爪哇虫草菌的产孢量逐渐增大达到极值；当 pH 在 7.5–8.5，光照时长在 12–18 h 之间时，菌株的产孢量由最值逐渐减小。

2.2.3 最佳产孢条件的预测和验证

通过 Design-Expert 8.0 软件^[19]对实验数据进行处理及模型响应值预测，同时对响应曲面图和等高线分析，获得爪哇虫草菌的最佳产孢

量条件为：培养基营养成分含量为 30.24 g/L，pH 值为 7.55，光照时长为 12.06 h，在该条件下，培养基的产孢量为 2.78×10^8 孢子/mL。为了验证此模型的有效性，同时考虑到实验操作的局限性和方便性，将最佳培养条件调整为：培养基营养成分含量 30 g，pH 值 7.50，光照时长 12 h，在此条件下进行 5 组平行验证实验，所得爪哇虫草菌产孢量的平均值为 $(2.78 \pm 0.05) \times 10^8$ 孢子/mL。实际测定结果与模型预测结果基本一致，因此表明实验结果与模型拟合良好，说明利用响应面法优化爪哇虫草菌 Bd01 最佳产孢量准确可靠，能真实反映各自变量对菌株产孢量的影响。

2.3 爪哇虫草菌 Bd01 对斜纹夜蛾 3 龄幼虫的毒力测定

2.3.1 爪哇虫草菌对斜纹夜蛾 3 龄幼虫的致死效果

爪哇虫草菌 Bd01 可以有效地侵染斜纹夜蛾 3 龄幼虫，并导致死亡，实验过程中发现斜纹夜蛾幼虫死亡初期活动力下降，保持湿度继续培养，发现虫体上长出白色菌丝，经过分离纯化后长出的菌落形态与最初接菌一致(图 12A、

12B)。由此可证明是由爪哇虫草菌侵染了斜纹夜蛾幼虫导致死亡，但在浓度较低时杀虫效果不明显。接菌 8 d 后，不同浓度的爪哇虫草菌孢子悬浮液对斜纹夜蛾 3 龄幼虫的校正死亡率如表 5 所示，结果表明随着孢子悬浮液浓度的增加，斜纹夜蛾 3 龄幼虫累计死亡率升高，孢子悬浮液浓度为 1.0×10^8 孢子/mL 时校正死亡率达最大值 88.68%。而孢子悬浮液浓度为 1.0×10^8 孢子/mL 时的校正死亡率显著高于 1.0×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 孢子/mL。当孢子悬浮液浓度较高($\geq 1.0 \times 10^7$ 个孢子/mL)时，累计死亡率在开始阶段上升速度很慢，随后变快，最后又变慢并逐渐趋于平稳(图 12C)。

2.3.2 爪哇虫草菌对斜纹夜蛾 3 龄幼虫的致死中时

不同浓度的孢子悬浮液对斜纹夜蛾 3 龄幼虫的毒力统计结果如表 6 所示。在爪哇虫草菌孢子浓度较低的情况下，斜纹夜蛾 3 龄幼虫的死亡率也相对较低，且 LT_{50} 有着明显的增加；而在其孢子浓度较高的情况下，对斜纹夜蛾 3 龄幼虫的致死率较高， LT_{50} 较短，具体表现为 LT_{50} 随着孢子悬浮液浓度的降低而升高。随

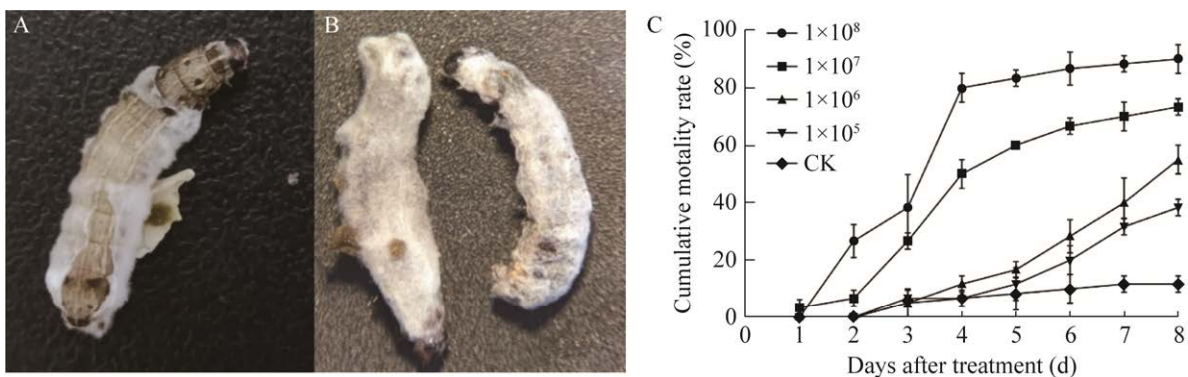


图 12 不同浓度爪哇虫草菌孢子悬浮液对斜纹夜蛾 3 龄幼虫的毒力和侵染症状

Figure 12 Toxicity and infection symptoms of *Cordyceps javanica* spore suspension with different concentrations to the 3rd instar larvae of *Spodoptera litura*. A: 2 days after the death of larvae. B: 3 days after larval death. C: The result of toxicity test. The data in the figure are mean±standard error. Different lowercase letters indicate significant differences between treatments at the 0.05 level.

表 5 不同浓度爪哇虫草菌孢子悬浮液对斜纹夜蛾 3 龄幼虫的累计死亡率(8 d)

Table 5 Cumulative mortality of different concentrations of *Cordyceps javanica* spore suspension to 3rd instar larvae of *Spodoptera litura* (8 d)

Concentration (spores/mL)	Average mortality (%)	Corrected mortality rate (%)
1×10^8	90.00	88.68±3.27a
1×10^7	73.33	69.81±1.89b
1×10^6	55.00	49.05±3.27c
1×10^5	38.33	30.19±1.89d
CK	11.67	—

Different lowercase letters indicate that the average value is significantly different at the level of 0.05.

随着孢子悬浮液浓度的增加,斜纹夜蛾 3 龄幼虫的死亡速度逐渐加快, LT_{50} 变小。当浓度为 1.0×10^8 孢子/mL 时,爪哇虫草菌对斜纹夜蛾 3 龄幼虫的致死速度最快, LT_{50} 为 3.11 d。当浓度为 1.0×10^5 孢子/mL 时,爪哇虫草菌对斜纹夜蛾 3 龄幼虫致死速度较慢, LT_{50} 为 9.69 d。

2.3.3 爪哇虫草菌对斜纹夜蛾 3 龄幼虫的致死中浓度

对斜纹夜蛾 3 龄幼虫不同处理天数的毒力

表 6 爪哇虫草菌对斜纹夜蛾 3 龄幼虫的致死中时

Table 6 LT_{50} of *Cordyceps javanica* to the 3rd instar larvae of *Spodoptera litura*

Concentration (spores/mL)	Regression equation	Correlation coefficient/ R^2	LT_{50} (d)	95% confidence limit
1×10^8	$Y=3.897x-1.923$	0.851	3.11	2.828–3.390
1×10^7	$Y=3.142x-2.070$	0.921	4.56	4.150–5.011
1×10^6	$Y=4.366x-3.907$	0.938	7.85	7.132–9.024
1×10^5	$Y=3.777x-3.725$	0.781	9.69	8.361–12.494

表 7 爪哇虫草菌对斜纹夜蛾 3 龄幼虫的致死中浓度

Table 7 LC_{50} of *Cordyceps javanica* to the 3rd instar larvae of *Spodoptera litura*

Treatment time (d)	Regression equation	Correlation coefficient/ R^2	LC_{50} (spores/mL)	95% confidence limit
8	$Y=0.513x-2.908$	0.934	4.68×10^5	$1.51 \times 10^5-1.05 \times 10^6$
7	$Y=0.570x-3.472$	0.923	1.23×10^6	$5.50 \times 10^5-2.46 \times 10^6$
6	$Y=0.691x-4.475$	0.928	2.96×10^6	$1.62 \times 10^6-5.42 \times 10^6$
5	$Y=0.794x-5.405$	0.923	6.45×10^6	$3.80 \times 10^6-1.14 \times 10^7$
4	$Y=0.861x-6.080$	0.940	1.15×10^7	$6.96 \times 10^6-2.04 \times 10^7$

统计结果如表 7 所示,通过对爪哇虫草菌孢子悬浮液浓度与死亡率进行拟合回归方程,结果表明,随着处理天数的增加,斜纹夜蛾幼虫的死亡虫数逐渐变多, LC_{50} 变小。爪哇虫草菌对斜纹夜蛾 3 龄幼虫的 LC_{50} 分别是:第 8 天为 4.68×10^5 孢子/mL,第 7 天为 1.23×10^6 孢子/mL,第 6 天为 2.96×10^6 孢子/mL,第 5 天为 6.45×10^6 孢子/mL,第 4 天为 1.15×10^7 孢子/mL。即爪哇虫草菌孢子悬浮液处理斜纹夜蛾 3 龄幼虫的时间越长,所需的 LC_{50} 越低。

2.4 爪哇虫草菌 Bd01 对斜纹夜蛾幼虫体内保护酶活性的影响

2.4.1 Bd01 对斜纹夜蛾幼虫体内过氧化氢酶 (CAT)活性的影响

经爪哇虫草菌 Bd01 处理后的斜纹夜蛾幼虫体内 CAT 活性变化如图 13A 所示,当处理时间在 12–72 h 之间时, CAT 活性呈现先上升后下降的趋势,分别在 48 h 和 72 h 时达到最大值 869.54 U/g 和最小值 603.08 U/g,其中最大值与同期对照相比显著提高,为同期对照的 1.44 倍。当处理时间在 12–48 h 之间时,爪哇虫草菌

Bd01 处理后能够显著诱导斜纹夜蛾幼虫体内的 CAT 活性, 各处理酶活性均大于同期对照; 当处理时间为 60 h 和 72 h 时, 斜纹夜蛾体内的 CAT 活性开始下降, 且低于同期对照的酶活性。

2.4.2 Bd01 对斜纹夜蛾幼虫体内过氧化物酶(POD)活性的影响

经爪哇虫草菌 Bd01 处理后的斜纹夜蛾幼虫体内 POD 活性变化如图 13B 所示, 处理 12 h 后斜纹夜蛾体内的 POD 活性显著上升, 达到 1 167.78 U/g, 为同期对照的 1.60 倍; 处理 24 h 后斜纹夜蛾体内 POD 活性依旧保持上升趋势, 达到 1 215.90 U/g, 为同期对照的 1.66 倍; 当处理时间为 36 h 时, 斜纹夜蛾体内 POD 活性开始下降, 但仍然高于同期对照; 当处理时间为 48 h 时, 斜纹夜蛾体内 POD 活性又呈现上升趋势达到最大值, 为 1 238.89 U/g, 是同期对照的 1.62 倍; 当处理时间在 60–72 h 之间时, 斜纹夜蛾体内 POD 活性开始下降, 且低于同期对照, 与同期对照相比差异显著; 整个处理时间段, 斜纹夜蛾体内 POD 活性呈现先上升后下降再上升, 最后降低, 显著低于同期对照; 而处理组不同时间段 POD 活性无明显变化, 差异不显著。

2.4.3 Bd01 对斜纹夜蛾幼虫体内超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

如图 13C 所示, 感染爪哇虫草菌 Bd01 的斜纹夜蛾幼虫不同处理间 SOD 活性具有显著性差异, 呈现先上升后下降的趋势变化, 对照组不同时间段之间酶活性无明显变化。当处理时间在 12–36 h 之间时, 斜纹夜蛾体内 SOD 活性随着处理时间延长而逐渐增大, 到 36 h 时达到最大值 2.34 U/g, 与同期对照组相比差异显著, 为对照的 1.50 倍; 当处理时间为 48–72 h 时, 斜纹夜蛾体内 SOD 活性开始下降; 当处理

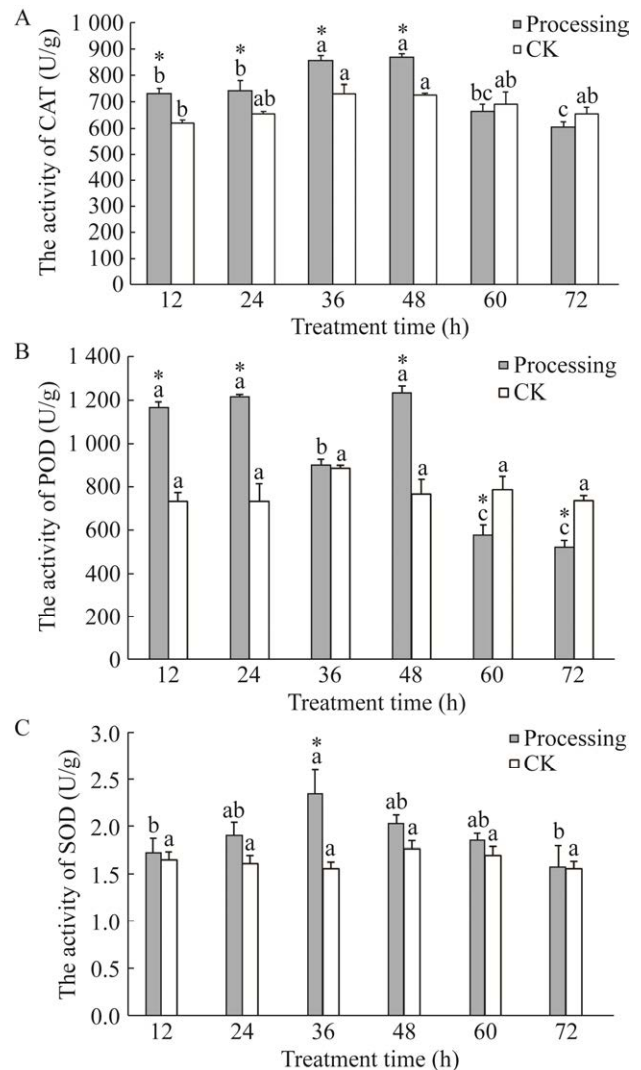


图 13 斜纹夜蛾感染爪哇虫草菌 Bd01 后体内 CAT (A)、POD (B)、SOD (C)活性变化

Figure 13 Changes of activities of CAT (A), POD (B), and SOD (C) in *Spodoptera litura* infected with *Cordyceps javanica* Bd01. The data in the figure are the average value±standard error. There are significant differences between different lowercase letters or CK treatments in different time ($P<0.05$). *: There is a significant difference between CK and treatment at the same time ($P<0.05$).

时间为 72 h 时, 斜纹夜蛾体内 SOD 酶活性最小, 为 1.58 U/g 但仍然高于同期对照 SOD 活性。整个处理时间段斜纹夜蛾体内 SOD 活性均高于对照组。

3 讨论与结论

不同菌株来源不同,对培养基营养成分和最佳培养条件需求也不同,因此需要对其培养基配方和最佳培养条件进行筛选^[21]。且不同的营养成分、最佳的碳源和光照等培养条件以及适宜生长的环境等对菌株产孢量影响较大^[22]。而提高菌株产孢量的有效手段是对其培养条件进行优化,优化真菌培养条件常用的方法有单因素试验、正交试验和响应面优化试验,单因素试验仅探究某一因素在一定条件下对目标值的影响,不能够得到多个因素间的交互作用对目标值的影响;若是采用正交试验则会增加工作量并且难以获得最优结果,而采用响应面分析法可以有效地从影响爪哇虫草菌产孢量的因子中筛选出主要影响因素,并且在减少工作量的同时实现条件优化,该统计学方法已经广泛应用于各类发酵培养基的优化,同时通过建立三维立体曲面图和等高线图能够更加直观地分析出各因素对产孢量的影响趋势^[23-25]。目前,响应面法优化被广泛应用于微生物发酵条件筛选^[26]。蒋冬花等^[27]优化曲霉(*Aspergillus sclerotiorum*) As-68 发酵工艺,优化后抑菌圈较优化前抑菌圈直径增大了 52.70%。本研究通过固态培养基优化培养条件,经响应曲面分析法验证培养基营养成分含量、pH 和光照时长 3 个因素对爪哇虫草菌 Bd01 产孢量的影响,其最优组合为:培养基营养成分含量 30 g/L, pH 值 7.50,光照时长 12 h,在该条件下,培养基的产孢量为 2.78×10^8 孢子/mL。经模型预测的值与实际值非常接近,同时配方能较好地满足规模化培养爪哇虫草菌的基本条件,且配方材料简单易得,成本较低,说明该研究具有较好的应用前景。

本研究的供试菌株爪哇虫草菌是一种重要

的虫生真菌,随着其孢子悬浮液浓度的增加,斜纹夜蛾 3 龄幼虫累计死亡率升高,用 1×10^8 孢子/mL 的孢子液处理 8 d 后,校正死亡率达最大值 88.68%。显著大于周立等^[28]研究的球孢白僵菌 SCAUYZ16 和 SCAUJH19 对斜纹夜蛾的校正死亡率 70.71% 和 57.84%。爪哇虫草对斜纹夜蛾 3 龄幼虫的 LT_{50} 随着孢子悬浮液浓度的降低而升高, LT_{50} 最小为 3.11 d,处理 8 d 后的 LC_{50} 为 4.68×10^5 孢子/mL。小于陈自宏等^[29]研究的绿僵菌 BUM1209 在 26 °C 对斜纹夜蛾 3 龄幼虫的致死中时 2.94 d;但大于郭利群等^[30]探究的蜡蚧轮枝菌对斜纹夜蛾 3 龄幼虫的致死中时 4.75 d。致死中浓度大于郭亚力等^[31]探究的球孢白僵菌对斜纹夜蛾的致死中浓度 2.19×10^5 孢子/mL。说明爪哇虫草 Bd01 菌株致病力较强,在生物防治应用中具有较大的潜力,同时也表明昆虫病原真菌的毒力强弱与不同来源、不同寄主的抗病能力、不同地理位置筛选的菌株以及实验条件存在差异等具有密切的联系^[32]。

保护酶对昆虫抵御外界微生物侵染至关重要。蒋春艳^[33]探究金龟子绿僵菌对黄曲条跳甲体内保护酶活性的影响,结果显示 SOD 和 POD 活性先升高后降低,CAT 活性变化总体趋势为先上升后下降再上升,最后下降。张琛等^[34]探究黏虫感染白僵菌后体内保护酶变化,结果显示保护酶活性整体均呈现先增加后降低的趋势。与此相似,本研究中爪哇虫草菌 Bd01 孢子悬浮液处理斜纹夜蛾 3 龄幼虫 72 h 后,POD 活性呈现先显著上升后下降再上升,最后降低的趋势;CAT、SOD 活性呈现先上升后下降的趋势。但三者酶活性变化的趋势出现在不同的时间段,可能是由于 3 种昆虫分属于不同的目,机体内部构造有所不同;亦有可能是由于斜纹夜蛾 3 龄幼虫感染爪哇虫草菌初期,其体内免疫系统为阻止病原菌对其进行侵染,增强酶活

力从而维持虫体的正常生理功能, 然而随着感染时间的延长, 爪哇虫草菌在斜纹夜蛾 3 龄幼虫体内大量增殖生长致使免疫系统严重破坏, 表现出体内保护酶活性迅速下降的现象。本研究为更好地研究爪哇虫草菌对斜纹夜蛾的作用机制及虫体内不同酶的作用方式提供了理论依据, 但仍还需从多角度进行深入探究以发挥其对害虫生物防治的作用。

参考文献

- [1] 陈代利, 梁永江, 李喜旺. 烟草斜纹夜蛾的发生与综合防治[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(16): 7153-7155, 7179.
CHEN DL, LIANG YJ, LI XW. Occurrence regularity and comprehensive prevention methods of *Spodoptera litura* Fabricius in tobacco[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2013, 41(16): 7153-7155, 7179 (in Chinese).
- [2] 秦厚国, 汪笃栋, 丁建, 黄荣华, 叶正襄. 斜纹夜蛾寄主植物名录[J]. 江西农业学报, 2006, 18(5): 51-58.
QIN HG, WANG DD, DING J, HUANG RH, YE ZX. Host plants of *Spodoptera litura*[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2006, 18(5): 51-58 (in Chinese).
- [3] 浦冠勤, 姜德义, 王军. 警惕斜纹夜蛾的发生与危害[J]. 中国蚕业, 2008, 29(4): 51-53.
PU GQ, JIANG DY, WANG J. Beware of the occurrence and harm of *Spodoptera litura*[J]. China Sericulture, 2008, 29(4): 51-53 (in Chinese).
- [4] WANG ZC, LIU SS, LU KJ, XU XY, ZHANG TY. Concentration, characterization and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in soils from the Corn Belt of Northeast China[J]. European Journal of Soil Science, 2020, 71(4): 654-666.
- [5] JARA EA, WINTER CK. Safety levels for organophosphate pesticide residues on fruits, vegetables, and nuts[J]. International Journal of Food Contamination, 2019, 6(1): 1-8.
- [6] 曹明章, 朱卫锋, 李存焕. 适于草坪斜纹夜蛾防治的绿色农药室内筛选[J]. 草业科学, 2013, 30(3): 461-464.
CAO MZ, ZHU WF, LI CH. Laboratory screening of green pesticides for controlling of turf pest *Prodenia litura*[J]. Pratacultural Science, 2013, 30(3): 461-464 (in Chinese).
- [7] 蒋希峰. 虫生真菌杀虫增效途径研究进展[J]. 黑龙江农业科学, 2022, 2(2): 95-99.
JIANG XF. Research progress on entomogenous fungi insecticidal synergistic ways[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2022, 2(2): 95-99 (in Chinese).
- [8] JAMUNARANI GS, RAMANAGOUDA SH, VENKATESHALU B, JAYAPPA J, RAGHAVENDRA G, RUDRESH DL, KULKARNI MS, MAHANTESHA BNN, GOPALI JB. Isolation and evaluation of indigenous endophytic entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* UHSB-END1 (*Hypocreales: Cordycipitaceae*), against *Spodoptera litura* Fabricius[J]. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 2022, 32(1): 1-15.
- [9] BATOOL Z, RIAZ MA, SAYED S, MAJEED MZ, AHMED S, ULLAH S. *In vitro* synergy of entomopathogenic fungi and differential-chemistry insecticides against armyworm *Spodoptera litura* Fabricius (*Lepidoptera: Noctuidae*)[J]. International Journal of Tropical Insect Science, 2022, 42(2): 1997-2006.
- [10] FITRIANA Y, SUHARJO R, SWIBAWA IG, SEMENGGUK B, PASARIBU LT, HARTAMAN M, RWANDINI RA, INDRIYATI I, PURNOMO P, SOLIKHIN S. *Aspergillus oryzae* and *Beauveria bassiana* as entomopathogenic fungi of *Spodoptera litura* Fabricius (*Lepidoptera: Noctuidae*) infesting corn in Lampung, Indonesia[J]. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 2021, 31(1): 1-12.
- [11] 胥志民. 莱氏绿僵菌及毒素对园林害虫斜纹夜蛾的致病性研究[D]. 聊城: 聊城大学硕士学位论文, 2019.
XU ZM. The pathogenicity of *Metarhizium rileyi* and toxin against the garden pest *Spodoptera litura*[D]. Liaocheng: Master's Thesis of Liaocheng University, 2019 (in Chinese).
- [12] 李洁, 李洁, 于乾龙, 郑桂玲, 张彬, 李长友. 鳞翅目昆虫抗病毒免疫反应的研究进展[J]. 环境昆虫学报, 2021, 43(5): 1079-1094.
LI J, LI J, YU QL, ZHENG GL, ZHANG B, LI CY. Advance research on antiviral immunity response in lepidopteran insects[J]. Journal of Environmental Entomology, 2021, 43(5): 1079-1094 (in Chinese).
- [13] DING JN, ZHENG HH, CHI DF. Effects of a pathogenic *Beauveria bassiana* (*Hypocreales: Cordycipitaceae*) strain on detoxifying and protective enzyme activities in *Xylotrechus rusticus* (*Coleoptera:*

- Cerambycidae*) larvae[J]. *Florida Entomologist*, 2015, 98(4): 1148-1156.
- [14] 曹兵伟. 爪哇虫草菌 Ij01[J]. *农药科学与管理*, 2021, 42(11): 72-73.
CAO BW. *Isaria javanica* Ij01[J]. *Pesticide Science and Administration*, 2021, 42(11): 72-73 (in Chinese).
- [15] KEPLER RM, LUANGSA-ARD JJ, HYWEL-JONES NL, QUANDT CA, SUNG GH, REHNER SA, AIME MC, HENKEL TW, SANJUAN T, ZARE R, CHEN MJ, LI ZZ, ROSSMAN AY, SPATAFORA JW, SHRESTHA B. A phylogenetically-based nomenclature for *Cordycipitaceae* (*Hypocreales*)[J]. *IMA Fungus*, 2017, 8(2): 335-353.
- [16] OU D, ZHANG LH, GUO CF, CHEN XS, ALI S, QIU BL. Identification of a new *Cordyceps javanica* fungus isolate and its toxicity evaluation against Asian citrus psyllid[J]. *MicrobiologyOpen*, 2019, 8(6): e760.
- [17] WU SH, TOEWS MD, CASTRILLO LA, BARMAN AK, COTTRELL TE, SHAPIRO-ILAN DI. Identification and virulence of *Cordyceps javanica* strain wf GA17 isolated from a natural fungal population in sweetpotato whiteflies (*Hemiptera: Aleyrodidae*)[J]. *Environmental Entomology*, 2021, 50(5): 1127-1136.
- [18] 刘全俊, 易璟, 吴国星, 高熹, 贾奔, 唐萍, 何明川, 石昆霁, 曾舒泉, 李金梁, 秦小萍. 一株咖啡灭字脊虎天牛幼虫虫生真菌鉴定、培养及致病力研究[J]. *西部林业科学*, 2022, 51(5): 89-96.
LIU QJ, YI J, WU GX, GAO X, JIA B, TANG P, HE MC, SHI KA, ZENG SQ, LI JL, QIN XP. The identification, cultivation and pathogenicity of an entomogenous fungus in larvae of *Xylotrechus quadripes* Chevrolat[J]. *Journal of West China Forestry Science*, 2022, 51(5): 89-96 (in Chinese).
- [19] 张胜兰, 邹晓, 商胜华, 于晓飞, 杨茂发. 响应面法优化蝉棒束孢 SLGY-2 产孢条件[J]. *环境昆虫学报*, 2020, 42(4): 1019-1027.
ZHANG SL, ZOU X, SHANG SH, YU XF, YANG MF. Optimization sporulation condition for *Cordyceps cicadae* SLGY-2 by response surface method[J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2020, 42(4): 1019-1027 (in Chinese).
- [20] 张胜兰, 刘健锋, 邹晓, 杨茂发, 商胜华. 蝉花 SLGY-2 对斜纹夜蛾生长发育及体内保护酶活性的影响[J]. *山地农业生物学报*, 2020, 39(4): 30-36.
ZHANG SL, LIU JF, ZOU X, YANG MF, SHANG SH. Effects of *Isaria cicadae* SLGY-2 on the development and protective enzyme activities *in vivo* of *Spodoptera litura*[J]. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 2020, 39(4): 30-36 (in Chinese).
- [21] 杨可, 司文, 林海, 林方锐, 袁静, 陈杰. 利用响应面分析法优化贝莱斯芽孢杆菌 TCS001 的发酵条件[J]. *农药学报*, 2019, 21(4): 444-452.
YANG K, SI W, LIN H, LIN FR, YUAN J, CHEN J. Fermentation condition optimization of *Bacillus velezensis* TCS001 using response surface methodology[J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2019, 21(4): 444-452 (in Chinese).
- [22] 邹东霞, 史国英, 廖旺姣, 蒋学建, 吴耀军, 蓝霞. 不同营养成分对桉蝙蛾高毒力球孢白僵菌生长的影响[J]. *西部林业科学*, 2016, 45(4): 158-161.
ZOU DX, SHI GY, LIAO WJ, JIANG XJ, WU YJ, LAN X. The influence of nutrients on the growth of high toxicity *Beauveria bassiana* of *Endoclyta signifer* Walke[J]. *Journal of West China Forestry Science*, 2016, 45(4): 158-161 (in Chinese).
- [23] 陈明, 穆凯热姆·阿卜来提, 刘政, 王晓东. 响应面法优化链霉菌 LG-9 发酵条件及对棉花黄萎病菌的抑菌作用[J]. *湖北农业科学*, 2018, 57(8): 71-76.
CHEN M, MUKARAM A, LIU Z, WANG XD. Optimization of fermentation conditions for anti-streptomycetes LG-9 using response surface methodology and its inhibiton on *Verticillium dahlia*[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2018, 57(8): 71-76 (in Chinese).
- [24] 夏邦华, 赵健, 宫娉, 韩小斌, 彭玉龙, 刘凯, 汪城墙, 丁延芹, 杜秉海. 基于响应面分析法优化解淀粉芽孢杆菌 DSYZ 发酵条件[J]. *山东农业大学学报(自然科学版)*, 2021, 52(2): 241-246.
XIA BH, ZHAO J, GONG P, HAN XB, PENG YL, LIU K, WANG CQ, DING YQ, DU BH. Optimal fermentation conditions for *Bacillus amyloliquefaciens* DSYZ based on response surface methodology[J]. *Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2021, 52(2): 241-246 (in Chinese).
- [25] 孙军德, 吴月, 李海群, 乔雪, 姜治民. 基于响应面分析法的不吸水链霉菌 001 菌株液体发酵条件优化[J]. *沈阳农业大学学报*, 2015, 46(4): 481-485.
SUN JD, WU Y, LI HQ, QIAO X, JIANG ZM. Optimization of culture conditions using response surface methodology for biomass production of *Streptomyces ahygroscopicus* 001 strain[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2015, 46(4): 481-485 (in Chinese).
- [26] 薛锐, 付玉飞, 杨光源, 彭跃进, 杜广祖, 陈斌. 响应面设计优化莱氏绿僵菌 SZCY 固体发酵培养条件及

- 致病力测定[J]. 微生物学通报, 2023, 50(2): 514-525.
- XUE R, FU YF, YANG GY, PENG YJ, DU GZ, CHEN B. Optimization of the solid-state fermentation conditions of *Metarhizium rileyi* SZCY by response surface methodology and determination of the virulence[J]. Microbiology China, 2023, 50(2): 514-525 (in Chinese).
- [27] 蒋冬花, 郭鑫, 马静静, 王炫栋, 杨孙玉悦. 拮抗水稻白叶枯病菌菌株核曲霉 As-68 菌株培养基配方和发酵条件的响应面优化[J]. 浙江师范大学学报(自然科学版), 2021, 44(2): 188-196.
- JIANG DH, GUO X, MA JJ, WANG XD, YANG SYY. Response surface optimization of medium formula and fermentation conditions for antagonistic strain As-68 against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*[J]. Journal of Zhejiang Normal University (Natural Science Edition), 2021, 44(2): 188-196 (in Chinese).
- [28] 周立, 张慎, 陈琳, 袁芳, 周向平, 黄石旺, 李佳颖. 斜纹夜蛾高致病力菌株的筛选及四种杀虫剂的毒力测定[J]. 黑龙江农业科学, 2022(4): 44-50.
- ZHOU L, ZHANG S, CHEN L, YUAN F, ZHOU XP, HUANG SW, LI JY. Screening of highly virulent strains of *Spodoptera litura* and virulence determination of four insecticides[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2022(4): 44-50 (in Chinese).
- [29] 陈自宏, 徐玲, 何馨成, 肖文祥, 柳青, 李芳. 滇西不同地区绿僵菌对斜纹夜蛾的毒力[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2020, 35(3): 430-435.
- CHEN ZH, XU L, HE QC, XIAO WX, LIU Q, LI F. The virulence of *Metarhizium* to *Spodoptera litura* in different areas of western Yunnan[J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 2020, 35(3): 430-435 (in Chinese).
- [30] 郭利群, 郭亚力. 蜡蚧轮枝菌对斜纹夜蛾幼虫的毒力测定[J]. 农业研究与应用, 2015(4): 6-10.
- GUO LQ, GUO YL. Toxicity determination of *Verticillium lecanii* against *Spodoptera litura*[J]. Agricultural Research and Application, 2015(4): 6-10 (in Chinese).
- [31] 郭亚力, 田学军, 罗思, 李秀晗. 球孢白僵菌对斜纹夜蛾幼虫的致病性研究[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(2): 100-101.
- GUO YL, TIAN XJ, LUO S, LI XH. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* to *Spodoptera litura* larvae[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2012, 40(2): 100-101 (in Chinese).
- [32] 张挺峰, 王睿, 刘长仲. 昆虫病原真菌长孢蜡蚧菌 TF-2 菌株对豌豆蚜的侵染过程和致病力[J]. 昆虫学报, 2020, 63(6): 744-750.
- ZHANG TF, WANG R, LIU CZ. Infection process and pathogenicity of entomopathogenic fungus *Lecanicillium longisporum* strain TF-2 to *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae)[J]. Acta Entomologica Sinica, 2020, 63(6): 744-750 (in Chinese).
- [33] 蒋春艳. 金龟子绿僵菌对黄曲条跳甲体内保护酶活性的影响[J]. 植物保护, 2022, 48(5): 129-133, 157.
- JIANG CY. Effects of infection by *Metarhizium anisopliae* on the activities of protective enzymes in *Phyllotreta striolata*[J]. Plant Protection, 2022, 48(5): 129-133, 157 (in Chinese).
- [34] 张琛, 陈思博, 吴晨源, 张步遥, 张瑛, 滕斌, 胡本进. 粘虫高毒力白僵菌菌株筛选及其感菌后虫体内保护酶活性的变化[J]. 核农学报, 2020, 34(12): 2701-2707.
- ZHANG C, CHEN SB, WU CY, ZHANG BY, ZHANG Y, TENG B, HU BJ. Screening of *Beauveria bassiana* strains with high virulence against armyworm and activities of protective enzymes in the larvae infected by fungi[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2020, 34(12): 2701-2707 (in Chinese).