

丝瓜藤对白僵菌生长的影响

吉志新¹, 温晓蕾¹, 王长青², 侯秀明³, 刘微¹

(1. 河北科技师范学院 生命科技学院 河北 秦皇岛 066600 2 河北科技师范学院 图书馆, 河北 秦皇岛 066600

3. 大连市农业科学研究院 辽宁 大连 116036)

摘要:以丝瓜藤为添加物, 添加到掺有黄粉虫幼虫的察氏培养基中, 采用平板培养法测定白僵菌菌株的生长速度、菌落形态特征、孢子大小、产孢量、孢子萌发率及 POD 酶活性。结果表明: 丝瓜藤能有效地抑制白僵菌的生长速率, 并且与丝瓜藤的添加量成正相关; 且对白僵菌的孢子大小等方面有显著促进作用。400 倍处理对孢子大小的效果最佳, 高达 $2.75000 \pm 0.1936 \mu\text{m}$; 25 倍处理对产孢量及孢子萌发率效果最好, 分别高达 $(5.59 \pm 0.2755) \times 10^8$ 个 cm^2 、 $(0.9668 \pm 4.0475)\%$; 12.5 倍处理后的白僵菌 POD 酶活性最高, 高达 0.2053 ± 0.0013 ; 与对照相比, 均达到了极显著水平。

关键词: 丝瓜藤; 白僵菌; 指标测定

中图分类号: S 642.4 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)05-0161-03

白僵菌 (*Beauveria* spp.) 是一种寄主范围广泛的昆虫病原真菌, 对多种昆虫有寄生作用, 特别是对鞘翅目及鳞翅目昆虫具有较强毒力。目前在多种农林害虫的生物防治中都取得了明显成效, 是世界上研究和应用最多的病原真菌之一, 但其自身受环境条件的影响比较大, 从而造成白僵菌应用效果不稳定, 起效慢等不足点^[12]。

丝瓜 (*Luffa*) 是葫芦科丝瓜属, 又名布瓜、天罗等, 其浑身是宝, 在生活中人们对它的利用主要是对果实的食用; 丝瓜筋用于厨房餐具清洗; 丝瓜藤、丝瓜花、丝瓜液、丝瓜藤等用于开发医疗保健产品。李程斌^[3] 等对丝瓜藤营养成分进行了分析, 发现丝瓜藤中含有大量的微量元素及粗纤维等营养物质, 刘微^[47] 等人对丝瓜伤流液进行了多种病原菌的抑菌试验, 并且对伤流液中的抑菌成分进行了初步测定, 结果发现其本身含有过氧化物酶等蛋白类物质。目前对白僵菌研究重点集中在工厂化生产和代谢物利用等方面, 虽有关于其生物学特性的报道, 但有关植物有机体对白僵菌的影响研究较少^[810]。现利用丝瓜藤作为培养基的添加物, 对白僵菌的生长状况、孢子特性及酶活性等指标进行了测定分析, 从而了解白僵菌对有机杀菌剂的抗逆性。

第一作者简介: 吉志新(1971-), 男, 硕士, 研究方向为经济昆虫学。
通讯作者: 刘微(1956-), 女, 河北昌黎人, 硕士, 研究员, 研究方向为农业生物资源。E-mail: g183428@163.com。
基金项目: 河北省科技厅资助项目 (06221004); 河北省教委科研资助项目 (2003308); 秦皇岛市科委资助项目。
收稿日期: 2009-11-20

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌种、丝瓜藤: 由河北科技师范学院植物保护实验室提供。

1.2 试验方法

基础培养基: 将察氏培养基中加入黄粉虫幼虫研碎物 (0.0625 g)。在 100 mL 基础培养基中分别加入 0.125、0.25、0.5、1、2、4、8 g 丝瓜藤, 以不加丝瓜藤的为对照, 共 8 个处理, 以 12.5、25、50、100、200、400、800 倍、CK 表示。

1.3 检测内容及方法

1.3.1 菌落形态特征及生长速率的测定 用直径 6 mm 的打孔器在培养皿中取一定面积的菌落, 接种于察氏培养基上, 置于 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的恒温培养箱中培养, 从第 3 天起开始记录菌落形态特征 (菌落厚度及颜色变化), 每 48 h 观察 1 次, 并用直尺 (最小单位 1 mm) 以十字交叉法测量各培养皿的菌落直径并记录, 分析比较各处理的营养生长状况。

1.3.2 孢子大小的测量 产孢后第 2 天, 用拨针挑取少量菌落制成临时玻片, 置于显微镜下观察各处理孢子大小, 采用目镜测微尺对每个处理随机测量 30 个孢子。

1.3.3 产孢量的测定 用直径为 8 mm 的打孔器在菌落中央到边缘的中点处取 1 菌饼, 移入小烧杯中, 加入 10 mL 0.01% 吐温-20 和无菌水, 充分振荡使孢子均匀分散配成孢子悬液, 用血球计数板测定孢子量, 每个处理重复 3 次, 分析比较各处理的产孢量。1 cm^2 菌落含孢量 = (平均每小格孢子数 $\times 4 \times 10^6 \times$ 稀释倍数) / (3.14 \times 0.16)。

1.3.4 孢子萌发率的测定 满皿后第2天,用直径为8 mm的打孔器在菌落中央到边缘的中点处取1菌饼,移入小烧杯中,加入3 mL 0.01%吐温-20和无菌水,配成孢子悬液,用微量移液器取10 μL滴在2%琼脂的载玻片上,每个处理4个重复,置于(25±1)℃下培养24 h后,在显微镜下镜检孢子萌发率(以孢子芽超过孢子的1/2为准),每个重复随机选取100个孢子。

1.3.5 丝瓜藤对白僵菌 POD 酶活性的测定 每个处理取1/4置于冰浴研磨,然后加入4 mL pH 7.8的0.05 mol/L的磷酸缓冲液,分装于2个离心管,在恒温±4℃,10 000转/min,离心30 min,用注射器吸取上清液,即为酶提取液,然后进行POD酶活性的测定。过氧化物酶活性=OD₄₇₀/(W×t)×(V₁/V₂);式中:OD₄₇₀为470 nm下的OD值;W为样品重(g);t为反应时间(min);V₂V₁为提取时酶液体积(mL);为反应时酶液体积(mL)。

2 结果与分析

2.1 白僵菌菌落形态特征及生长速率的测定

由表1可以看出,丝瓜藤对白僵菌的形态特征及生长速率有着明显的影响:菌落的生长速率以对照最快,高达(0.5644±0.0179)cm/d,并且随着丝瓜藤添加量的增加,其生长速率逐渐缓慢,说明丝瓜藤能有效的抑制白僵菌的生长,其中以12.5、25倍的抑制效果最为显著,其生长速率仅为(0.2851±0.0357)cm/d和(0.2845±0.0078)cm/d;相反,菌落的厚度与丝瓜藤添加量呈正相关,随着添加量的减少,菌落厚度逐渐增加,与对照相比,除800倍处理无明显变化外,其它处理菌落厚度均有所提高,其中25倍、12.5倍处理的菌落最厚,其它处理次之,说明丝瓜藤对白僵菌菌丝密度有促进作用。从菌落颜色变化可以发现:与对照相比,除800倍外,其它处理在颜色变化及时间上均有所不同,400倍、200倍、100倍处理在接菌120 h后变为乳黄色,25倍、12.5倍处理在接菌216 h后变为微黄色,说明丝瓜藤对白僵菌菌落的颜色有很大影响。

表1 不同培养基上白僵菌生长速率、菌丝厚度及颜色变化

处理/倍	菌丝生长速率/ cm·d ⁻¹	菌落厚度	菌落颜色
CK	0.5644±0.0179 ^{aA}	+	接种192 h 淡黄色
800	0.5147±0.0288 ^{aAB}	+	接种192 h 淡黄色
400	0.4785±0.0218 ^{aB}	++	接种120 h 乳黄色
200	0.3377±0.0388 ^c	++	接种120 h 乳黄色
100	0.3299±0.0314 ^c	+++	接种120 h 乳黄色
50	0.3323±0.0185 ^c	+++	接种120 h 乳黄色
25	0.2845±0.0078 ^{dC}	++++	接种216 h 微黄色
12.5	0.2851±0.0357 ^{dC}	++++	接种216 h 微黄色

注“+”表示菌落厚度,“+”越多表示菌落厚度越厚即菌丝密度越大;字母表示显著水平,相同字母间差异不显著,不同字母间差异显著;小写字母表示P≤0.05的显著水平,大写字母表示P≤0.01的显著水平。

2.2 对孢子大小的影响

由表2可以看出,不同处理对孢子大小的影响不同。与对照相比,400、25、200倍处理达到了显著水平,并且400倍处理达到了极显著水平,孢子大小达到(2.75000±0.1936)μm;而12.5倍和50倍处理,对孢子大小起到了抑制作用。说明适量的丝瓜藤对孢子的大小具有促进作用,400倍处理效果最佳。

表2 不同培养基上孢子大小及差异

处理/倍	孢子大小/μm	差异显著水平	
		5%显著水平	1%显著水平
400	2.75000±0.1936	a	A
25	2.63636±0.2050	a	AB
200	2.61364±0.2335	a	ABC
800	2.56818±0.2759	ab	ABC
100	2.34091±0.3583	bc	BC
CK	2.33000±0.1960	bc	BC
12.5	2.29545±0.5456	c	C
50	2.29545±0.3677	c	C

2.3 对产孢量的影响

与对照相比,用丝瓜藤处理后的培养基,除100、400、800处理外,其余产孢量均有所提高,其中以25倍处理产孢量最高,达到极显著水平,产孢量高达(5.59±0.2755)×10⁸个/g;而100倍、400倍、800倍处理对产孢量有抑制作用,与对照相比,100倍和800倍已达到极显著水平,其产孢量仅为(2.88±0.1535)×10⁸个/g和(2.73±0.1542)×10⁸个/g。由此可见,适量的添加丝瓜藤对白僵菌的产孢量具有促进作用,最佳处理为25倍。

表3 丝瓜藤对白僵菌产孢量的影响

处理/倍	平均孢子个数 /×10 ⁸ 个·cm ⁻²	差异显著水平	
		5%显著水平	1%显著水平
25	5.59±0.2755	a	A
200	5.32±0.2502	a	AB
12.5	5.12±0.2522	a	AB
50	4.71±0.2518	b	AB
CK	4.19±0.0615	c	B
400	3.84±0.2506	c	BC
100	2.88±0.1535	d	C
800	2.73±0.1542	d	C

2.4 对白僵菌孢子萌发率的影响

由表4可以看出,丝瓜藤对白僵菌的孢子萌发有着很大的影响,与对照相比,其孢子萌发率均有提高,并达到了极显著水平。其中以25倍处理培养基上的孢子的

表4 白僵菌在不同丝瓜藤培养基上的孢子萌发率情况

处理/倍	孢子萌发率/%	差异显著水平	
		5%显著水平	1%显著水平
25	0.9668±4.0475	a	A
12.5	0.9418±4.2453	a	AB
50	0.8918±4.3107	b	BC
100	0.8750±2.9738	b	C
200	0.8000±2.8740	c	D
400	0.7083±3.4326	d	E
800	0.6835±2.4171	d	E
CK	0.5750±1.6741	e	F

萌发百分率最高, 约为 96.68%, 在 12.5 贸易培养基上孢子萌发的百分率次之, 约为 94.18%, 而 CK 的孢子萌发率仅为 57.50%。说明丝瓜藤对白僵菌的孢子萌发率具有提高作用, 其最佳处理为 25 倍, 即丝瓜藤添加量为 4 g/100mL。

2.5 丝瓜藤对白僵菌 POD 酶活性的影响

由表 5 可看出, 丝瓜藤对白僵菌的 POD 酶活性有着显著的提高作用。与对照相比, 除 800 倍处理外, 其它处理的 POD 酶活性均达到了显著水平, 各处理之间存在着明显的差异性, 其中以 12.5 倍处理后的酶活性最高, 高达 0.2053±0.0013, 25 倍处理次之, 为 0.1323±0.0041, 而对照仅为 0.0004±0.0012。由此可见, 12.5 倍处理效果最佳。

表 5 丝瓜藤对白僵菌 POD 酶活性的影响

处理/倍	过氧化物酶活性	差异显著水平	
		5%显著水平	1%显著水平
12.5	0.2053±0.0013	a	A
25	0.1323±0.0041	b	B
50	0.0791±0.0013	c	C
200	0.0600±0.0013	d	D
100	0.0413±0.0013	e	E
400	0.0174±0.0014	f	F
CK	0.0004±0.0012	g	G
800	0.0027±0.0013	g	G

3 结论与讨论

试验结果表明, 丝瓜藤对白僵菌的生长速率具有抑制作用, 并且与丝瓜藤的添加量呈正相关; 菌落的颜色及变色时间也受添加量的影响; 同时, 丝瓜藤对白僵菌也存在着显著的促进作用, 主要表现在对孢子大小、孢

子萌发率及 POD 酶活性这三方面; 而对白僵菌的产孢量无明显影响。

从菌落的营养生长阶段来看, 丝瓜藤对白僵菌起到了抑制作用, 原因可能是丝瓜藤中的所含的氢氰酸成分起到了作用; 从有性生长阶段及 POD 酶活性来看, 丝瓜藤对白僵菌起到了促进作用, 说明丝瓜藤中的具有很高的营养价值。另一方面, 该试验也表明不同的丝瓜藤添加量对白僵菌的作用不同, 不适当的用量同样会导致孢子大小、产孢量等方面的降低。

参考文献

[1] 徐四琼, 孙倩, 曾德亮. 白僵菌研究与应用的现状 & 展望[J]. 安徽农学通报, 2005, 11(7): 71-72.
[2] 曹万友. 我国白僵菌的研究现状及问题[J]. 黄山高等专科学校学报, 2001, 3(2): 117-118.
[3] 李程斌, 李恩, 郑艳, 等. 丝瓜藤和叶营养成分分析[J]. 安徽师范大学学报 2009 32(1): 69-71.
[4] 刘微, 高书国, 朱小平, 等. 丝瓜伤流液对灰葡萄孢的抑制活性[J]. 植物病理学报 2004, 34(30): 280-282.
[5] 刘微, 朱小平, 王之岭, 等. 丝瓜伤流液对果蔬几种病菌的抑制活性[J]. 中国农学通报 2004 20(3): 224-226.
[6] 刘微, 高书国, 朱小平, 等. 丝瓜伤流液对真菌的生物活性[J]. 河北职业技术学院学报 2002 16(4): 73-75.
[7] 刘微, 朱小平, 赵惠芝, 等. 丝瓜伤流液中抑菌相关成分的初步测定[J]. 河北科技师范学院学报, 2009, 23(3): 24-28.
[8] 张永军, 王中康. 白僵菌的生物学特性及对小麦蚜虫的毒力[J]. 西南农业大学学报, 2001, 23(2): 144-146.
[9] 徐庆丰. 白僵菌安全性及其作为微生物杀虫剂的评价[J]. 生物防治通报 1991, 7(2): 77-80.
[10] 王成树. 真菌杀虫剂剂型研究现状(综述)[J]. 安徽农业大学学报 1996(23): 375-380.

Effect of *Luffa* Vine on Growth of *Beauveria bassiana*

Ji Zhi-xin¹, WEN Xiao-lei¹, WANG Chang-qing², HOU Xiur-ming³, Liu Wei¹

(1. College of Life Science and Technology Hebei Normal University of Science and Technology; 2. Library, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao, Hebei 066600; 3. Dalian Academy of Agricultural Sciences Dalian, Liaoning 116036)

Abstract: *Luffa* vine was used as additives and added into Czapek's medium with *tenebrio molitor* larvae. The colony growth speed, colony shape feature, spore size, sporulation quantity, spore germination and POD activity of *Beauveria bassiana* was observed with the plate culture method. The results showed that it could effectively inhibit the growth rate of *Beauveria bassiana*, and the growth rate was positive correlation with *luffa* addition; but it exhibited make promotion against spore size ect. The 400x was the best effect on spores size, reached (2.75000±0.1936) μm; the best effect on sporulation quantity and spore germination were the 20x, which were reached (5.59±0.2755)×10⁸ ind/cm²、(0.9668±4.0475)%; the 12.5x was the highest POD activity of *Beauveria bassiana*, reached 0.2053±0.0013; Compared to the control, they all reached extremely significant level.

Key words: *Beauveria bassiana*; *Luffa*; measured leaf meal