

球孢白僵菌在牛蒡苗期的定殖研究

查锦宏¹, 蒙怡¹, 朱蕴兰^{1,2}, 邵颖^{1,2*}, 陈安徽^{1,2}, 张爱文¹, 曹阳¹, 岳明宇¹, 朱文静¹

(1. 徐州工程学院食品与生物工程学院, 江苏徐州 221111; 2. 江苏省食品资源开发与质量安全重点建设实验室, 徐州工程学院, 江苏徐州 221111)

摘要 为研究球孢白僵菌在牛蒡苗中的定殖情况, 采用浸种法、灌根法处理牛蒡种子, 种植后每隔 7 d 取牛蒡苗采用组织研磨涂布法检测球孢白僵菌在牛蒡苗中的定殖情况, 研究球孢白僵菌在牛蒡苗不同组织中的分布状况与定殖规律。结果表明, 灌根和浸种法均能将球孢白僵菌成功定殖于牛蒡苗中, 但浸种法优于灌根法。灌根处理 7 d 时, 牛蒡苗中未检测出球孢白僵菌, 14 d 时牛蒡苗根、茎、叶中球孢白僵菌定殖量达最大值, 随后随着时间的延长定殖量逐渐降低; 浸种处理组在出苗第 7 天时即有球孢白僵菌定殖, 随后定殖量下降, 在第 28 天时定殖量又升高; 牛蒡种子浸种 72 h 处理后种植, 球孢白僵菌定殖效果优于浸种 48 h 处理, 第 28 天时 72 h 浸种组牛蒡苗根、茎、叶中球孢白僵菌定殖量较 48 h 浸种组分别高 34.18%、51.79% 和 29.66%。

关键词 球孢白僵菌; 牛蒡; 苗期; 定殖

中图分类号 S482.3 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)09-0141-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.09.036



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on Colonization of *Beauveria bassiana* in Burdock Seedling Stage

ZHA Jin-hong¹, MENG Yi¹, ZHU Yun-lan^{1,2} et al (1. College of Food and Biological Engineering, Xuzhou University of Technology, Xuzhou, Jiangsu 221111; 2. Jiangsu Key Construction Laboratory of Food Resource Development and Quality Safe, Xuzhou University of Technology, Xuzhou, Jiangsu 221111)

Abstract In order to clarify the colonization of *Beauveria bassiana* in the roots and stems of burdock seedling, soaking and root-irrigation methods were used to detect the colonization of *Beauveria bassiana* in the burdock seedlings. The result showed that *Beauveria bassiana* could be successfully colonized in the burdock seedlings, soaking method was better than root-irrigation. There was no *Beauveria bassiana* in seedling of burdock at the 7 d. The colonization amount of *Beauveria bassiana* at the 14 d was up to the highest level, and then, the *Beauveria bassiana* amount was decreased. In the soaking treatment group, *Beauveria bassiana* started to colonized in burdock seedling, then the colonization amount decreased, and then increased at 28 d. After soaking seeds of burdock for 72 h, the colonization effect was better than that of for 48 h. The colonization amount of *Beauveria bassiana* in the root, stem and leaf of burdock seedling of 72 h soaking treatment group were 34.18%, 51.79% and 29.66% higher than that of 48 h soaking treatment group.

Key words *Beauveria bassiana*; Burdock; Seedling stage; Colonization

牛蒡(*Arctium lappa*)又名大力子、东洋参、东洋牛鞭菜等, 属菊科 2 年生大型草本植物, 是药菜兼用植物, 具有较高的食用及保健价值^[1-3]。研究显示, 牛蒡叶提取物具有抗氧化、抗菌、抗病毒、降压、增高白血球及兴奋中枢神经系统等药理作用; 牛蒡子提取物具有抗氧化、抗菌、抗炎、抗病毒、抗肿瘤、神经保护、利尿、免疫调节、降血糖、降血脂及对热休克反应的抑制活性^[4-9]; 牛蒡根提取物能明显降低高脂大鼠的总胆固醇及甘油三酯水平, 升高高密度脂蛋白胆固醇水平^[10]; 牛蒡子和牛蒡根对治疗 HIV 也有一定的作用^[11]。因此, 牛蒡及牛蒡产品的消费量日益增加, 牛蒡种植及加工产业已成为牛蒡主产区的重点发展产业。牛蒡种植过程中会受到病虫害的危害, 常见病害有黑斑病、角斑病、白粉病、茎腐病、炭疽病、枯萎病、花叶病等, 其中黑斑病、白粉病、茎腐病是牛蒡主要病害, 严重影响牛蒡的产量及品质。传统的防治牛蒡病害的方法主要是化学方法。但随着人们对食品安全的重视, 特别是国外对进口农产品农残检测标准要求的提高, 使用化学农药防治病虫害受到了极大的限制, 严重制约了牛蒡的生产。寻找高效的生物防治手段防治牛蒡病害将是牛蒡无公害生产及其产业持续性发展的重要保障。

球孢白僵菌(*B. bassiana*)是可以导致昆虫白僵病的一种

真菌, 是生物防治中最重要的种类^[12-13]。目前已被开发用于真菌杀虫剂, 并被广泛应用于防治农林害虫并产生了显著的经济、生态和社会效益, 研究显示虫生真菌在植物组织定殖与植株的抗病能力直接相关^[14-16]。笔者采用不同接种方式接种球孢白僵菌, 考察了球孢白僵菌在牛蒡苗期的定殖情况, 为球孢白僵菌在作物抗病方面的应用提供参考。

1 材料与方法**1.1 材料与仪器**

1.1.1 试验样品。牛蒡种子购于河南丰登种业有限公司。球孢白僵菌菌株保存于徐州工程学院食品(生物)工程学院发酵工程实验室。

1.1.2 仪器设备与试剂。仪器设备: 梅特勒 AE200 型电子天平, 上海分析仪器厂; Senco R-502B 型旋转蒸发器, 上海申胜生物技术公司; 数显式电热恒温水浴锅 HH-4, 国华电器有限公司; 超纯水系统, PALL Cascada LS 颇尔公司; 可调高速匀浆机 FSH-2A, 金坛市华城润华实验仪器厂; 生物显微镜 BM2000, 江南永新光学有限公司; 真空冷冻干燥机 LGJ-10, 上海比朗仪器有限公司; 超低温冰箱 MDF594, 日本 SANYO 电子有限公司; 涡旋混匀器 HYQ-3111, 美国精骐有限公司。

试剂: 葡萄糖, 上海源叶生物科技有限公司; 无水乙醇, 徐州师范大学科技开发总公司化工厂; 过氧化氢, 天津市福晨化学试剂厂; 氢氧化钠, 天津市福晨化学试剂厂; 吐温 80, 国药集团化学试剂有限公司。

基金项目 江苏省高等学校自然科学基金面上项目(17KJD550003)。
作者简介 查锦宏(1998—), 男, 安徽安庆人, 从事应用微生物学研究。
* 通信作者, 副教授, 博士, 从事微生物资源开发与应用研究。
收稿日期 2019-12-06; 修回日期 2020-10-16

1.1.3 培养基。SDAY 培养基:蛋白胨 1%、酵母浸膏 1%、琼脂 2%、葡萄糖 4%。

1.2 试验方法

1.2.1 球孢白僵菌的培养及孢悬液的制备。将球孢白僵菌接种于 SDAY 培养基并于 25℃ 条件下恒温培养,待产孢后刮取球孢白僵菌孢子于 0.05% 的 Tween-80 水溶液,充分振荡后再使用无菌水配制成浓度为 1×10^8 CFU/mL 的球孢白僵菌孢悬液,备用。

1.2.2 浸种与种植。选取颗粒大小均一的牛蒡种子,先用无菌水冲洗后再用 70% 的乙醇溶液进行表面消毒 2~3 min,之后使用无菌水冲洗几遍,再用 2% 的氢氧化钠溶液进行表面消毒,最后再用无菌水冲洗。晾干后,每 100 粒牛蒡种子浸泡在 20 mL 浓度为 1×10^8 CFU/mL 的孢子悬浮液中,25℃、120 r/min 条件下浸种。浸种 48 h 处理的设置为 48 h 处理组;浸种 72 h 处理的设置为 72 h 处理组;另设对照组 CK1 和 CK2,用 0.05% 的 Tween-80 的水溶液浸种 48 和 72 h 的处理组分别设置为 CK1 和 CK2 处理组。种子处理后于无菌条件下自然风干。沙土高压蒸汽灭菌后装入无菌花盆,将

处理好的牛蒡种子播种于花盆并在表层覆盖一层约 1 cm 的灭菌土,浇适量的无菌水。

1.2.3 灌根。将表面消毒后的牛蒡种子随机分为灌根处理组和空白对照 CK3 组,2 组播种于盛放无菌土的花盆中。待种植后的第 7 天,灌根组用 50 mL 浓度为 1×10^8 CFU/mL 的球孢白僵菌孢子悬浮液灌根处理;CK3 组用 0.05% 的吐温-80 水溶液灌溉牛蒡苗。

1.2.4 定殖量检测。经浸种和灌根处理的牛蒡待出苗后的第 7、14、21、28 天取苗,随机剪取牛蒡苗的根、茎、叶各 1 g 于研钵中,加入 2 mL 0.05% 吐温-80 溶液并采用研磨法研磨牛蒡苗的根、茎、叶组织,匀浆液进行梯度稀释后采用涂布法涂布于 SDAY 平板培养基中,于 25℃ 下恒温培养后记录各植物组织中球孢白僵菌的数量,并计算球孢白僵菌在 1 g 牛蒡苗组织中的数量。

2 结果与分析

2.1 球孢白僵菌在牛蒡根中的定殖量 采用灌根和浸种的方法接种球孢白僵菌孢悬液,检测牛蒡出苗不同时期牛蒡苗根中球孢白僵菌的数量,结果见表 1。

表 1 球孢白僵菌在小麦根际的定殖量

Table 1 Colonization of *Beauveria bassiana* in wheat rhizosphere

CFU/g

处理 Treatment	7 d	14 d	21 d	28 d
CK1	0	0	0	0
浸种 48 h Soaking seeds for 48 h	$(6.24 \pm 0.76) \times 10^3$ b ^{###}	$(5.81 \pm 0.11) \times 10^3$ c [#]	$(2.35 \pm 0.26) \times 10^2$ c	$(3.13 \pm 0.12) \times 10^2$ c
CK2	0	0	0	0
浸种 72 h Soaking seeds for 72 h	$(7.67 \pm 0.05) \times 10^3$ a ^{###}	$(6.64 \pm 0.28) \times 10^3$ b [#]	$(3.82 \pm 0.21) \times 10^2$ b	$(4.20 \pm 0.02) \times 10^2$ a
CK3	0	0	0	0
灌根 Root-irrigation	0	$(6.18 \pm 0.18) \times 10^3$ a ^{###}	$(5.09 \pm 1.03) \times 10^3$ a [#]	$(3.73 \pm 0.05) \times 10^2$ b

注:不同小写字母表示不同处理差异显著($P < 0.05$)。#表示同一处理组不同时间差异显著($P < 0.05$)。##表示差异极显著($P < 0.01$)

Note: Different lowercase letters mean significant difference between different treatment groups ($P < 0.05$). # means significant difference between the same treatment group at different times ($P < 0.05$), ## means extremely significant difference ($P < 0.01$)

由表 1 可知,3 组空白对照组均未检测到球孢白僵菌。在牛蒡出苗第 7 天时,灌根组的牛蒡根际未检测到球孢白僵菌。浸种 48 和 72 h 组的牛蒡苗根中球孢白僵菌的菌落数显著高于出苗后期,而浸种 72 h 组在牛蒡苗根部的定殖量比浸种 48 h 组高 22.92%。浸种处理组随着出苗时间的延长球孢白僵菌在根中的定殖量不断减少,但在第 28 天时又有所增

加,但灌根组根中球孢白僵菌的定殖量随着出苗时间的延长逐渐减少。比较 3 个试验组牛蒡苗中球孢白僵菌的定殖量,浸种 72 h 更有利于球孢白僵菌在牛蒡苗根中的定殖。

2.2 球孢白僵菌在牛蒡苗茎中的定殖量 采用灌根法和浸种法处理牛蒡种子,待牛蒡出苗后测定出苗不同时期牛蒡不同组织中球孢白僵菌的定殖量,结果见表 2。

表 2 球孢白僵菌在小麦茎中的定殖量

Table 2 Colonization of *Beauveria bassiana* in wheat stem

CFU/g

处理 Treatment	7 d	14 d	21 d	28 d
CK1	0	0	0	0
浸种 48 h Soaking seeds for 48 h	$(7.09 \pm 0.02) \times 10^3$ b ^{###}	$(5.88 \pm 0.01) \times 10^3$ c [#]	$(1.13 \pm 0.02) \times 10^2$ c	$(1.95 \pm 0.04) \times 10^2$ b
CK2	0	0	0	0
浸种 72 h Soaking seeds for 72 h	$(8.29 \pm 0.03) \times 10^3$ a ^{###}	$(7.01 \pm 0.04) \times 10^3$ b [#]	$(2.11 \pm 0.05) \times 10^2$ b	$(2.96 \pm 0.02) \times 10^2$ a
CK3	0	0	0	0
灌根 Root-irrigation	0	$(7.93 \pm 0.02) \times 10^3$ a ^{###}	$(5.79 \pm 0.03) \times 10^3$ a [#]	$(2.91 \pm 0.05) \times 10^2$ a

注:不同小写字母表示不同处理差异显著($P < 0.05$)。#表示同一处理组不同时间差异显著($P < 0.05$)。##表示差异极显著($P < 0.01$)

Note: Different lowercase letters mean significant difference between different treatment groups ($P < 0.05$). # means significant difference between the same treatment group at different times ($P < 0.05$), ## means extremely significant difference ($P < 0.01$)

由表 2 可知,空白对照组牛蒡苗茎中始终未有球孢白僵菌。出苗第 7 天时,灌根组的牛蒡苗茎中也未检测到球孢白僵菌,这与根中球孢白僵菌定殖特征相似;在出苗第 14 天时

球孢白僵菌定殖量达到最大,但随后随着时间的延长定殖量逐渐减少。第 7 天时,浸种 72 h 组的牛蒡苗茎中球孢白僵菌的定殖量显著高于浸种 48 h 组,高出 16.92%;浸种 48 和

72 h 组牛蒡苗茎中定殖量呈先下降后上升的趋势,在出苗第 28 天时,灌根组和浸种 72 h 组牛蒡苗茎中定殖量显著高于浸种 48 h 组,灌根组与浸种 72 h 组间虽无显著差异,但浸种 72 h 组定殖量高于灌根组。综合比较 3 个试验组牛蒡苗中

球孢白僵菌的定殖量,浸种 72 h 组优于其他试验组。

2.3 球孢白僵菌在牛蒡苗叶中的定殖量 采用“1. 2. 4”的试验方法检测灌根和浸种处理牛蒡种子后牛蒡苗叶中球孢白僵菌的定殖量,具体试验结果见表 3。

表 3 球孢白僵菌在小麦叶中的定殖量

Table 3 Colonization of *Beauveria bassiana* in wheat leaves

CFU/g

处理 Treatment	7 d	14 d	21 d	28 d
CK1	0	0	0	0
浸种 48 h Soaking seeds for 48 h	$(5.85 \pm 0.04) \times 10^3$ b ^{##}	$(4.93 \pm 0.02) \times 10^3$ c [#]	$(1.96 \pm 0.05) \times 10^2$ c	$(2.36 \pm 0.04) \times 10^2$ b
CK2	0	0	0	0
浸种 72 h Soaking seeds for 72 h	$(6.29 \pm 0.02) \times 10^3$ a ^{##}	$(5.90 \pm 0.03) \times 10^3$ b [#]	$(2.79 \pm 0.06) \times 10^2$ b	$(3.06 \pm 0.03) \times 10^2$ a
CK3	0	0	0	0
灌根 Root-irrigation	0	$(6.01 \pm 0.03) \times 10^3$ a ^{##}	$(4.89 \pm 0.02) \times 10^3$ a [#]	$(2.12 \pm 0.03) \times 10^2$ c

注:不同小写字母表示不同处理差异显著($P < 0.05$)。#表示同一处理组不同时间差异显著($P < 0.05$),##表示差异极显著($P < 0.01$)

Note: Different lowercase letters mean significant difference between different treatment groups ($P < 0.05$). # means significant difference between the same treatment group at different times ($P < 0.05$), ## means extremely significant difference ($P < 0.01$)

由表 3 可知,球孢白僵菌在牛蒡苗叶中的定殖规律与在根、茎中的一致,牛蒡出苗后,浸种 72 h 组牛蒡苗叶中球孢白僵菌的定殖量显著高于 48 h 组,但 2 个试验组中牛蒡叶中定殖量均呈先降低后升高的趋势,在第 28 天时 72 h 浸种组牛蒡叶中定殖量比 48 h 浸种组高 29.66%。灌根组在牛蒡出苗第 14 天检测才检测到叶中的球孢白僵菌,随后随着时间的延长定殖量逐渐下降。综合比较 3 个试验组牛蒡苗叶中球孢白僵菌的定殖量,浸种 72 h 更有利于球孢白僵菌的定殖。

3 结论

在牛蒡出芽期间采用浸种处理和灌根处理接种球孢白僵菌,研究球孢白僵菌在牛蒡苗根、茎、叶中的定殖情况。结果发现,灌根处理和浸种处理均能够成功将球孢白僵菌定殖在牛蒡苗中,浸种处理较灌根处理更有利于球孢白僵菌的定殖。灌根处理组牛蒡在出苗第 7 天时没有球孢白僵菌定殖,但浸种处理组已成功定殖。灌根处理组在出苗第 14 天时球孢白僵菌定殖量达到最大值,且高于浸种处理组,随后定殖量逐渐降低;浸种处理 48 和 72 h 组,球孢白僵菌在牛蒡苗根、茎、叶中的定殖规律相同,均呈定殖量先降低再上升的趋势。浸种 72 h 组在不同时期的球孢白僵菌定殖量显著高于 48 h 组,因此,采用浸种方式且浸种 72 h 更有利于球孢白僵菌在牛蒡苗期的定殖。

参考文献

[1] 边巴次仁,尼玛仓决,赤列旺久,等. 中草药牛蒡子化学成分及药理研究进展[J]. 中国兽药杂志,2018,52(9):67-74.

- [2] CHAN Y S, CHENG L N, WU J H, et al. A review of the pharmacological effects of *Arctium lappa* (burdock) [J]. *Inflammopharmacology*, 2011, 19(5):245-254.
- [3] SUSANTI S, IWASAKI H, ITOKAZU Y, et al. Tumor specific cytotoxicity of arctigenin isolated from herbal plant *Arctium lappa* L. [J]. *Journal of natural medicines*, 2012, 66(4):614-621.
- [4] 陈会敏,徐安利,黄陈伟,等. 牛蒡子对实验性高血脂血症大鼠降血脂效应及其机理研究[J]. 中华中医药学刊,2010,28(3):626-627.
- [5] 尹丹丹,温新宝,袁保刚,等. 牛蒡子提取物的抗氧化活性研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2011,39(4):201-204,210.
- [6] 黄少花,黄礼德,刘胜利,等. 牛蒡子提取物镇痛抗炎作用的实验研究[J]. 右江民族医学院学报,2012,34(1):7-9.
- [7] 马松涛,刘冬恋,牛锐,等. 牛蒡子苷治疗糖尿病肾病的随机双盲安慰剂多中心Ⅲ期临床试验[J]. 中国临床药理学杂志,2011,27(1):15-18.
- [8] 安益国. 牛蒡子苷对糖尿病小鼠糖脂代谢的影响[J]. 河南中医,2013,33(2):193-195.
- [9] 黄姗姗,丁玉. 牛蒡抗氧化成分提取工艺的优化及性能测定[J]. 安徽农业科学,2011,39(9):5383-5386.
- [10] 赵秀梅,张富康,沈洪昇,等. 牛蒡根 4 种提取物体外抗肿瘤活性的比较研究[J]. 中国药房,2012,23(15):1351-1353.
- [11] 郭默然,张鹏英,郭艳玲,等. 牛蒡低聚果糖生理活性的研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2013,25(1):146-149.
- [12] 高红,张冉,万永继. 白僵菌的分类研究进展[J]. 蚕业科学,2011,37(4):730-736.
- [13] 任巧云. 对硬蜱高致病性虫生真菌菌株的分离、鉴定与筛选[D]. 北京:中国农业科学院,2013.
- [14] CITO A, BARZANTI G P, STRANGI A, et al. Cuticle-degrading proteases and toxins as virulence markers of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin [J]. *Journal of basic microbiology*, 2016, 56(9):941-948.
- [15] 马淑娟. 白僵菌和绿僵菌对樟巢螟的致病力及林间防治[D]. 福州:福建农林大学,2013.
- [16] COSSENTINE J E. Laboratory and field evaluations of the susceptibility of immature *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera : Tortricidae) to *Beauveria bassiana* (Hypocreales : Cordycipitaceae) [J]. *Biocontrol science and technology*, 2013, 23(4):396-408.