

王 丰, 范余娟. 5 种长白山有毒真菌提取液的抑菌杀虫活性[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(3): 126–129.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.040

5 种长白山有毒真菌提取液的抑菌杀虫活性

王 丰^{1,2}, 范余娟²

(1. 吉林农业科技学院, 吉林吉林 132101; 2. 吉林省长白山动植物资源利用与开发实验室, 吉林吉林 132101)

摘要:以 5 种长白山有毒真菌为原料, 对其活性成分的提取工艺进行初步研究, 并对提取液的抑菌作用及其对榆绿毛萤叶甲、蚜虫的杀虫活性进行研究。结果表明, 提取液对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌均有明显的抑制效果, 对酵母、青霉、米根霉、黑曲霉的抑菌效果不明显; 提取液对榆绿毛萤叶甲、蚜虫的致死效果从强到弱依次为红柄牛肝菌 > 红菇 > 毛头乳菇 > 鹅膏菌 > 皂味口蘑。

关键词:长白山; 有毒真菌; 提取液; 生物活性; 抑菌效果

中图分类号: Q939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)03-0126-04

生物源农药因具有对人、畜安全, 不污染环境, 不易引起抗药性, 在自然环境中易降解等特点, 已引起国内外学者高度重视, 并成为当今农药研究的热点^[1]。研究发现, 一些大型真菌的子实体从来不被昆虫侵袭, 受伤后的子实体及其发酵培养物中可以产生具有抗真菌、杀虫等多种活性的次生代谢产物^[2-3]。通过对一些大型有毒真菌的子实体或代谢产物进行抗虫活性试验发现, 大型有毒真菌中含有的多种抗虫活性物质如毒蝇碱、毒肽、毒伞肽等可以直接用于毒杀害虫, 也可

以作为生物源农药研究和开发的材料。目前利用大型真菌提取物在黏虫、桃潜叶蛾、棉铃虫、小菜蛾的拒食和毒杀活性方面的研究已有报道, 但是在蚜虫、榆绿毛萤叶甲方面的研究报道较少, 笔者用 85% 乙醇提取长白山有毒真菌的有效成分, 并对其生物活性进行研究, 旨在为充分开发利用该植物资源奠定基础, 并为有毒真菌的高效利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

供试菌种: 枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、青霉、米根霉、黑曲霉、酵母(由吉林农业科技学院实验室提供); 有毒真菌: 红柄牛肝菌、红菇、毛头乳菇、皂味口蘑、鹅膏菌(采集于白山市八道江镇长白山原始林区)。

试验仪器: 722 型紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司)、电子恒温水浴锅、高温高压蒸汽灭菌锅等。

主要试剂有乙醇、三氯甲烷、丙酮、石油醚、牛肉膏、蛋白

收稿日期: 2014-11-06

基金项目: 吉林省教育厅“十二五”科学技术研究课题(编号: 吉教科合字[2013]第 331 号); 吉林农业科技学院储备基金(编号: 吉农院合字[2012]第 417 号); 吉林省长白山动植物资源利用与开发实验室资助项目(编号: 吉农院合字[2012]第 724 号)。

作者简介: 王 丰(1973—), 女, 吉林永吉人, 硕士, 副教授, 从事分析化学、天然产物提取等科研与教学工作。E-mail: jlnkxjgc@126.com。

[23] Ahmad M. Key to the Indomalayan termites [parts 1 and 2] [J]. *Biologia*, 1958, 4(1): 63.

[24] 陆 军. 江苏进口木材中有害生物的疫情调查研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.

[25] 陆 军, 张绍红, 孙曼旻, 等. 进境巴布亚新几内亚原木检疫现状[J]. *植物检疫*, 2009, 23(5): 55–57.

[26] 曾令涛, 陈伟雄, 薛奎伟, 等. 从巴布亚新几内亚进口的原木中截获端明乳白蚁[J]. *植物检疫*, 1998, 12(5): 35–37.

[27] Thorne B L, Carpenter J M. Phylogeny of the Dictyoptera [J]. *Systematic Entomology*, 1992, 17(3): 253–268.

[28] Hill G F. Termites (Isoptera) from the Australian Region [J]. Melbourne: Council for Scientific and Industrial Research, 1942, 24: 149–153.

[29] Bourguignon T, Roisin Y. Revision of the termite family Rhinotermitidae (Isoptera) in New Guinea [J]. *Zoo Keys*, 2011, 148: 64.

[30] 张 强, 张绍红, 周 培, 等. 从来自澳大利亚的桉树上截获大唇乳白蚁[J]. *植物检疫*, 2006, 20(1): 61–62.

[31] Gay F J. The synonymy, distribution and biology of *Coptotermes elisae* (Desneux) [J]. *Pacific Insects*, 1963, 5(2): 421–423.

[32] Hill G F. Australian termites (Isoptera). Biological notes and descriptions of new species. [J]. *Proceedings of the Royal Society of Victoria*, 1932, 44(1): 134–154.

[33] 张绍红. 从苏里南木材上截获南美乳白蚁[J]. *植物检疫*, 1996, 10(6): 43.

[34] Hagen H A. Monographie der termiten [J]. *Entomologica*, 1858, 12(4): 198.

[35] Adamson A M. Preliminary report on termites and termite damage in Trinidad, West Indies [J]. *Tropical Agriculture*, 1937, 14(5): 141–149.

[36] 潘 杰, 任 越, 颜柳松, 等. 连云港局全国首次截获检疫性害虫——美墨乳白蚁[J]. *植物检疫*, 2012, 26(4): 59.

[37] 周 培, 张绍红, 汪利忠. 从进口原木上截获阿曼乳白蚁[J]. *植物检疫*, 2006, 20(1): 64.

[38] 刘领军. 进口木材中的非洲乳白蚁[J]. *植物检疫*, 1999, 13(5): 298–299.

[39] 陆 军, 周 培, 张绍红, 等. 张家港局截获中间乳白蚁[J]. *植物检疫*, 2006, 20(1): 62–63.

[40] 汪利忠, 周 培, 俞 伟. 进境原木上截获林乳白蚁[J]. *植物检疫*, 2006, 20(5): 268.

豚等,均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 真菌提取液的制备 将采集于白山市八道江镇长白山原始林区的野生有毒真菌在室温下避光晾干后粉碎成粗粉,通过单因素试验和正交试验(表 1、表 2),找到超声辅助乙醇提取的最佳工艺条件^[4-5]。

表 1 长白山有毒真菌提取工艺的因素水平设计

水平	因素			
	A:料液比 (g : mL)	B:时间 (min)	C:温度 (℃)	D:乙醇浓度 (%)
1	1 : 30	10	20	75
2	1 : 20	30	40	85
3	1 : 10	20	30	95

表 2 长白山有毒真菌提取工艺的正交试验结果

编号	A:料液比	B:时间	C:温度	D:乙醇浓度	<i>D</i> _{322 nm}
1	1	1	1	2	0.381
2	1	2	2	1	0.386
3	1	3	3	3	0.372
4	2	1	3	1	0.374
5	2	2	1	3	0.369
6	2	3	2	2	0.383
7	3	1	2	3	0.377
8	3	2	3	2	0.382
9	3	3	1	1	0.378
<i>k</i> ₁	0.380	0.377	0.376	0.379	
<i>k</i> ₂	0.375	0.379	0.382	0.382	
<i>k</i> ₃	0.379	0.378	0.376	0.373	
<i>R</i>	0.005	0.002	0.006	0.009	

确定最佳条件为 A₁B₂C₂D₂,即料液比为 1 g : 30 mL、提取时间为 30 min、提取温度为 40 ℃、乙醇浓度为 85%,在此条件下制备真菌提取液备用。

1.2.2 真菌提取液的抑菌性测定 采用滤纸片法测定真菌提取液的抑菌性:在牛肉膏蛋白胨培养基平板上分别涂布 0.2 mL 金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌菌悬液,在 PDH 培养基平板上分别涂布 0.2 mL 米根霉、青霉、酵母、黑曲霉悬液;然后将灭过菌的滤纸片浸在提取液中,放入培养皿中,细菌指示菌(金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌)于 30 ℃ 培养,霉菌指示菌(米根霉、青霉、酵母、黑曲霉)于 35 ℃ 培养,做 3 ~ 4 个平行,细菌置于 30 ℃ 培养箱中培养 24 h,霉菌置于 35 ℃ 培养箱中培养 24 h 后,测量滤纸片抑菌圈直径大小,抑菌圈越大,表明抑菌效果越好。

1.2.3 真菌提取液对榆绿毛萤叶甲的杀虫活性测定 榆绿毛萤叶甲的浸渍法(即喂毒和触杀法)处理:将榆绿毛萤叶甲采集到干燥的塑料瓶中备用,共采样 18 份。预先准备 18 个纯净的塑料瓶,用剪刀将瓶口剪大,剪取 18 片足够包裹住瓶口的纱布,并分别在纱布上做记号,另外准备 18 根皮套及若干棉花团、棉花片备用。每种粗提液做 3 组对照,将 5 种粗提液分别倒入 5 个小烧杯中,分别浸泡榆绿毛萤叶甲 5 s,将浸泡后的榆绿毛萤叶甲分别放置在 18 个纯净的塑料瓶中,在瓶中加入一小团稍微捏干(水不会流出)的湿棉花,且在每个瓶

子中放入 2 张榆树叶,将棉花片浸湿后稍微捏干放置在瓶口,一半遮盖一半敞开,然后用纱布包裹住瓶口,再用皮套系牢,防止虫子从瓶中跑出。以清水作对照,所有步骤处理好后,置于 25 ℃ 恒温培养箱中培养。

1.2.4 真菌提取液对蚜虫的杀虫活性测定 蚜虫的浸渍法(即喂毒和触杀法)处理:采集带蚜虫的叶片(带茎),将大虫用挑针剔除,在培养皿中装一半沙子,加水浸湿后将水倒出,在培养皿上盖 1 层培养皿口大小的报纸,其上挖 1 个小洞(每种粗提液做 3 组,1 组培养 24 h,另一组培养 48 h,共需准备 36 个这样的培养皿,分别做好标记),准备好待用。将 5 种粗提液分别倒入 5 个小烧杯中,分别浸泡蚜虫 5 s;另以清水作对照。将处理好的带蚜虫叶的茎插入到待用培养皿上报纸的小洞中,有蚜虫的一端朝上。所有步骤处理好后,置于 25 ℃ 的恒温培养箱中培养。

2 结果与分析

2.1 有毒真菌提取物对榆绿毛萤叶甲的作用

将按“1.2.3”节步骤处理的榆绿毛萤叶甲培养 24 h 后,打开纱布,查看并统计虫的死亡数(用镊子轻轻碰触,腿会动弹的为活虫,反之为死虫),结果见表 3。

表 3 用有毒真菌原液浸渍培养榆绿毛萤叶甲 24 h 后的结果

试剂	死亡数(头)			死亡率 (%)
	I	II	III	
清水	0	0	0	0
红菇原液	11	13	12	80.0
皂味口蘑原液	7	4	6	37.8
毛头乳菇原液	11	11	11	73.3
红柄牛肝菌原液	13	13	13	86.7
鹅膏菌原液	9	3	7	42.2

注:每个处理的样品总数为 15 头。表 4 至表 9 同。

继续将棉花片浸湿后稍微捏干放置在瓶口,一半遮盖一半敞开,然后用纱布包裹住瓶口,用皮套系牢,48 h 后观察,结果见表 4。

表 4 用有毒真菌原液浸渍培养榆绿毛萤叶甲 48 h 后的结果

试剂	死亡数(头)			死亡率 (%)
	I	II	III	
清水	0	0	0	0
红菇原液	11	13	12	80.0
皂味口蘑原液	8	5	6	42.2
毛头乳菇原液	11	11	11	73.3
红柄牛肝菌原液	13	13	13	86.7
鹅膏菌原液	9	4	8	46.7

从表 3、表 4 可以看出,经浸渍法处理 24、48 h 后的榆绿毛萤叶甲在清水中全部存活,而在红柄牛肝菌溶液中的死亡率最高,红菇次之,乳菇再次之,且在这 3 种溶液中的死亡率都达到了 70% 以上,说明这 3 种溶液对榆绿毛萤叶甲有强的致死作用,在皂味口蘑和鹅膏菌溶液中的死亡率均为 40% 左右,说明它们对榆绿毛萤叶甲致死作用相对较弱。

从表 5、表 6 中可以看出,有毒真菌原液稀释 10 倍后的致死效果仍是红柄牛肝菌 > 红菇 > 毛头乳菇 > 鹅膏菌 > 皂味口蘑,但榆绿毛萤叶甲的死亡率降低将近一半,总的来说,还

表 5 用稀释 10 倍的有毒真菌原液浸渍培养
榆绿毛蚱叶甲 24 h 后的结果

试剂	死亡数(头)			死亡率 (%)
	I	II	III	
清水	0	0	0	0
稀释 10 倍的红菇原液	7	8	6	46.7
稀释 10 倍皂味口蘑原液	3	2	3	17.8
稀释 10 倍的毛头乳菇原液	6	7	6	42.2
稀释 10 倍的红柄牛肝菌原液	8	9	9	57.8
稀释 10 倍的鹅膏菌原液	5	3	4	26.7

表 6 用稀释 10 倍的有毒真菌原液浸渍培养
榆绿毛蚱叶甲 48 h 后的结果

试剂	死亡数(头)			死亡率 (%)
	I	II	III	
清水	0	0	0	0
稀释 10 倍的红菇原液	8	8	6	48.9
稀释 10 倍的皂味口蘑原液	3	3	3	20.0
稀释 10 倍的毛头乳菇原液	6	8	7	46.7
稀释 10 倍的红柄牛肝菌原液	9	9	9	60.0
稀释 10 倍的鹅膏菌原液	5	4	4	28.9

是有致死效果的。

由表 7、表 8、表 9 可以看出,有毒真菌原液稀释 20 倍的死亡率为 0,但将榆绿毛蚱叶甲浸泡在稀释后的粗提液中 5 s 后,榆绿毛蚱叶甲的动态不同,活泼榆绿毛蚱叶甲的数量排序为清水>皂味口蘑>鹅膏菌>毛头乳菇>红菇>红柄牛肝菌,说明毒性顺序依次增强;同时发现,在清水中的榆绿毛蚱叶甲异常活泼(在瓶子中上下爬行),在红柄牛肝菌稀释液中的榆绿毛蚱叶甲虽然没死,但榆绿毛蚱叶甲的行动能力明显减弱,一般聚集在瓶子的底部,只有 1~2 头在瓶壁缓慢爬行。

表 7 用稀释 20 倍的原液浸渍培养榆绿毛蚱叶甲 24 h 后的结果

试剂	死亡数(头)			死亡率 (%)
	I	II	III	
清水	0	0	0	0
稀释 20 倍的红菇原液	0	0	0	0
稀释 20 倍的皂味口蘑原液	0	0	0	0
稀释 20 倍的毛头乳菇原液	0	0	0	0
稀释 20 倍的红柄牛肝菌原液	0	0	0	0
稀释 20 倍的鹅膏菌原液	0	0	0	0

表 8 用稀释 20 倍的原液浸渍培养榆绿毛蚱叶甲 48 h 后的结果

试剂	死亡数(头)			死亡率 (%)
	I	II	III	
清水	0	0	0	0
稀释 20 倍的红菇原液	0	0	0	0
稀释 20 倍皂味口蘑原液	0	0	0	0
稀释 20 倍的毛头乳菇原液	0	0	0	0
稀释 20 倍的红柄牛肝菌原液	0	0	0	0
稀释 20 倍的鹅膏菌原液	0	0	0	0

从以上数据可以看出,致死效果从强到弱依次为红柄牛肝菌>红菇>毛头乳菇>鹅膏菌>皂味口蘑,将原液稀释 10 倍,榆绿毛蚱叶甲的死亡率降低将近一半;将原液稀释 20 倍,其死亡率为 0,说明在这些菌液中能致死的成分不多。

表 9 用稀释 20 倍的原液浸渍培养榆绿毛蚱叶甲 72 h 后的结果

试剂	死亡数(头)			死亡率 (%)
	I	II	III	
清水	0	0	0	0
稀释 20 倍的红菇原液	0	0	0	0
稀释 20 倍的皂味口蘑原液	0	0	0	0
稀释 20 倍的毛头乳菇原液	0	0	0	0
稀释 20 倍的红柄牛肝菌原液	0	0	0	0
稀释 20 倍的鹅膏菌原液	0	0	0	0

2.2 有毒真菌提取物对蚜虫的作用

将按“1.2.4”节中相关步骤处理的蚜虫培养 24 h 后,用挑针将蚜虫逐个挑入到装有乙醇的大烧杯中,观察蚜虫的动态(直接沉底的为死虫,会展开腿游的为活虫),同时记录相关数据(表 10);48 h 的处理方法同理,其结果见表 11。

表 10 用原液浸渍培养蚜虫 24 h 后的结果

试剂	死亡数(头)			死亡率 (%)
	I	II	III	
清水	0	0	0	0
红菇原液	30	29	29	73.3
皂味口蘑原液	13	14	13	33.3
毛头乳菇原液	26	27	26	65.8
红柄牛肝菌原液	32	33	35	83.3
鹅膏菌原液	16	15	15	38.3

注:每个处理的样品总数为 40 头。表 11 至表 16 同。

表 11 用原液浸渍培养蚜虫 48 h 后的结果

试剂	死亡数(头)			死亡率 (%)
	I	II	III	
清水	0	0	0	0
红菇原液	30	30	30	75.0
皂味口蘑原液	14	14	14	35.0
毛头乳菇原液	27	28	26	67.5
红柄牛肝菌原液	33	34	35	85.0
鹅膏菌原液	18	16	16	41.7

从表 10、表 11 可以看出,经浸渍法处理 24、48 h 后的蚜虫在清水中全部成活,而在红柄牛肝菌溶液中的死亡率最高,红菇次之,乳菇再次之,且在这 3 种溶液中的死亡率都达到了 60% 以上,说明这 3 种溶液对蚜虫有强的致死作用;在皂味口蘑和鹅膏菌溶液中的死亡率均在 33%~42%,说明这 2 种溶液对其致死作用相对较弱。

从表 12、表 13 中可以看出,有毒真菌原液稀释 10 倍后的致死效果从强到弱仍是红柄牛肝菌>红菇>毛头乳菇>鹅膏菌>皂味口蘑,但蚜虫的死亡率降低将近一半,总的来说,还是有致死效果的。

表 12 用稀释 10 倍的原液浸渍培养蚜虫 24 h 后的结果

试剂	死亡数(头)			死亡率 (%)
	I	II	III	
清水	0	0	0	0
稀释 10 倍的红菇原液	17	17	18	43.3
稀释 10 倍的皂味口蘑原液	7	6	7	16.7
稀释 10 倍的毛头乳菇原液	13	14	13	33.3
稀释 10 倍的红柄牛肝菌原液	25	26	26	64.2
稀释 10 倍的鹅膏菌原液	10	9	10	24.2

表 13 用稀释 10 倍的原液浸渍培养蚜虫 48 h 后的结果

试剂	死亡数(头)			死亡率 (%)
	I	II	III	
清水	0	0	0	0
稀释 10 倍的红菇原液	18	18	18	45.0
稀释 10 倍的皂味口蘑原液	7	7	8	18.3
稀释 10 倍的毛头乳菇原液	14	14	14	35.0
稀释 10 倍的红柄牛肝菌原液	26	27	26	65.8
稀释 10 倍的鹅膏菌原液	11	11	10	26.7

由表 14、表 15、表 16 可以看出,虽然有毒真菌原液稀释 20 倍的蚜虫死亡率为 0,但将蚜虫浸泡在稀释后的粗提液中 5 s 后,蚜虫的动态不同,活泼蚜虫数从多到少依次为清水>皂味口蘑>鹅膏菌>毛头乳菇>红菇>红柄牛肝菌,说明毒性顺序依次增强;在清水中的蚜虫异常活泼(在瓶子中上下爬行),在红柄牛肝菌中的蚜虫虽然没死,但蚜虫的行动能力明显减弱,一般聚集在瓶子的底部,只有 1~2 头在瓶壁缓慢爬行。

表 14 用稀释 20 倍的原液浸渍培养蚜虫 24 h 后的结果

试剂	死亡数(头)			死亡率 (%)
	I	II	III	
清水	0	0	0	0
稀释 20 倍的红菇原液	0	0	0	0
稀释 20 倍的皂味口蘑原液	0	0	0	0
稀释 20 倍的毛头乳菇原液	0	0	0	0
稀释 20 倍的红柄牛肝菌原液	0	0	0	0
稀释 20 倍的鹅膏菌原液	0	0	0	0

表 15 用稀释 20 倍的原液浸渍培养蚜虫 48 h 后的结果

试剂	死亡数(头)			死亡率 (%)
	I	II	III	
清水	0	0	0	0
稀释 20 倍的红菇原液	0	0	0	0
稀释 20 倍的皂味口蘑原液	0	0	0	0
稀释 20 倍的毛头乳菇原液	0	0	0	0
稀释 20 倍的红柄牛肝菌原液	0	0	0	0
稀释 20 倍的鹅膏菌原液	0	0	0	0

从上述数据可以看出,致死效果为红柄牛肝菌>红菇>毛头乳菇>鹅膏菌>皂味口蘑,将原液稀释 10 倍,蚜虫的死亡率将近降低一半,而将原液稀释 20 倍,蚜虫的死亡率为 0,说明在这些菌液中能致死的成分不多。

2.3 抑菌作用

提取液对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌均有明显的抑菌效果,对酵母、青霉、米根霉、黑曲霉的抑制效果很弱。用浓缩液对 4 种霉菌做抑菌性试验,抑菌效果仍然不明

表 16 用稀释 20 倍的原液浸渍培养蚜虫 72 h 后的结果

试剂	死亡数(头)			死亡率 (%)
	I	II	III	
清水	0	0	0	0
稀释 20 倍的红菇原液	0	0	0	0
稀释 20 倍的皂味口蘑原液	0	0	0	0
稀释 20 倍的毛头乳菇原液	0	0	0	0
稀释 20 倍的红柄牛肝菌原液	0	0	0	0
稀释 20 倍的鹅膏菌原液	0	0	0	0

显。由此可以推断,鹅膏菌提取液对细菌的抑制活性从强到弱依次为金黄色葡萄球菌>枯草芽孢杆菌>大肠杆菌,对 4 种霉菌抑制活性不明显(表 17)。

表 17 真菌提取液对 7 种指示菌的抑菌效果

供试菌种	抑菌圈直径(mm)				平均值
	I	II	III	IV	
金黄色葡萄球菌	24.0	25	24.0	23.0	24.000
大肠杆菌	18.0	21	20.0	18.0	19.250
枯草芽孢杆菌	21.5	23	21.5	22.0	22.000
米根霉	6.0	6	7.0	6.5	6.375
青霉	6.0	5	6.0	4.0	5.250
酵母	6.0	0	0	0	1.500
黑曲霉	6.0	6	7.0	7.0	6.500

3 结论

本研究表明,有毒真菌提取液对金黄葡萄球菌、大肠杆菌、枯草杆菌均有明显的抑菌效果,对酵母、青霉、米根霉、黑曲霉的抑菌效果不明显;提取液对榆绿毛蚱叶甲和蚜虫的致死效果排序为红柄牛肝菌>红菇>毛头乳菇>鹅膏菌>皂味口蘑,将原液稀释 10 倍,榆绿毛蚱叶甲的死亡率将近降低一半;将原液稀释 20 倍,虫的死亡率为 0,说明在这些菌液中能致死的成分不多。

参考文献:

[1]李首昌,刘凤沂,马建华. 生物农药的开发与应用[J]. 现代化农业,2002(7):10-11.
[2]刘吉开. 高等真菌化学[M]. 北京:中国科学技术出版社,2004.
[3]高锦明. 高等真菌代谢产物[M]. 杨凌:西北农林科技大学出版社,2003.
[4]王 丰,赵 权. 串红花色素的提取与稳定性研究[J]. 江苏农业科学,2010(6):473-475.
[5]王 丰,赵 敏,薛晓丽. 杭白菊多糖超声提取工艺的研究[J]. 北方园艺,2012(2):28-31.