

白僵菌和乙酰甲胺磷对水稻抗氧化状态 及土壤氮循环的影响*

杜威¹ 江萍¹ 周骏¹ 卜元卿² 刘常宏³ 戴传超^{1**}

(1. 南京师范大学生命科学学院 江苏省微生物资源产业化工程技术研究中心 江苏省微生物与功能基因组学重点实验室 南京 210023; 2. 环境保护部南京环境科学研究所 南京 210042; 3. 南京大学生命科学学院 南京 210093)

摘要 为了考察微生物农药白僵菌施用后在水稻系统中的生态安全性及其环境行为, 本文通过盆栽试验探讨了施加不同浓度白僵菌孢子悬液 [7.5×10^4 (孢子)·mL⁻¹, 7.5×10^5 (孢子)·mL⁻¹, 7.5×10^6 (孢子)·mL⁻¹, 7.5×10^7 (孢子)·mL⁻¹] 和化学农药乙酰甲胺磷对接种二化螟的水稻氧化还原状态及土壤氮循环相关的生物化学过程强度的影响。结果表明, 白僵菌处理对土壤氨化作用和硝化作用具有一定刺激作用, 最大提高幅度分别为 12.4% 和 36.8%; 对反硝化作用表现为低浓度促进、高浓度抑制。乙酰甲胺磷处理在第 10 d 时对土壤氨化作用、硝化作用和反硝化作用的抑制率分别达到 18.6%、45.3% 和 27.5%。乙酰甲胺磷处理后水稻 AsA : DHA(还原态抗坏血酸 : 氧化态抗坏血酸) 比值和 GSH : GSSG(还原态谷胱甘肽 : 氧化态谷胱甘肽) 比值降低, 并伴随抗氧化能力的降低。与此相反, 白僵菌处理能够提高 AsA : DHA 和 GSH : GSSG。H₂O₂ 含量变化的结果表明二化螟接种和乙酰甲胺磷处理会导致过氧化程度升高, 而白僵菌的施加缓解了二化螟引起的过氧化状态。本试验使用荧光定量 PCR 对白僵菌的残留进行研究, 结果表明稻谷中并未有白僵菌残留, 白僵菌施用后对人类健康无害。上述结果表明, 与化学农药乙酰甲胺磷相比, 白僵菌是一种环境友好型的微生物农药, 其中 7.5×10^4 (孢子)·mL⁻¹ 的使用浓度效果较好。

关键词 白僵菌 乙酰甲胺磷 水稻 氧化还原状态 硝化作用 氨化作用 反硝化作用 定量 PCR
中图分类号: S511.4+1 **文献标识码**: A **文章编号**: 1671-3990(2014)02-0165-06

Effects of *Beauveria bassiana* and acephate on rice antioxidant status and soil nitrogen circulation

DU Wei¹, JIANG Ping¹, ZHOU Jun¹, BU Yuanqing², LIU Changhong³, DAI Chuanchao¹

(1. Jiangsu Engineering and Technology Research Center for Industrialization of Microbial Resources; Jiangsu Key Laboratory for Microbes and Functional Genomics; College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China;
2. Nanjing Institute of Environmental Science, Ministry of Environment Protection, Nanjing 210042, China;
3. College of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract *Beauveria bassiana* is a common entomopathogenic fungus with a global distribution. Isolates of *B. bassiana* can antagonize a variety of soil and plant pathogens. At present, studies have focused on *B. bassiana* insecticidal mechanism and symbiosis with plants. In order to investigate the ecological safety of *B. bassiana* and its environmental behavior in paddy systems, we conducted a potted trial to evaluate the effects of different concentrations of *B. bassiana* spore suspensions and chemical pesticide (acephate) on the redox state of rice and the intensity of biochemical processes related to soil nitrogen circulation. *B. bassiana* were expressed with the *egfp* gene (green fluorescent protein gene) through transformation with a vector, and real-time polymerase chain reaction (PCR) was used to detect *B. bassiana* in rice grains. To accomplish this, *B. bassiana* specific DNA primers (eGFP-F1/eGFP-R1) were designed after the green fluorescent protein sequence marked *B. bassiana*. Amplification of *B. bassiana* DNA yielded a single 289 bp-long product using the eGFP-F1/eGFP-R1 primers. The detection limit was 10 fg·μL⁻¹ of *B. bassiana* genomic DNA.

* 环境保护部环保公益性行业科研专项项目(201009023)资助

** 通讯作者: 戴传超, 主要从事微生物生态学研究。E-mail: daichuanchao@njnu.edu.cn

杜威, 主要从事微生物农药的环境安全性评价研究。E-mail: 644040549@qq.com

收稿日期: 2013-08-19 接受日期: 2013-11-12

The pot experiments consisted of seven treatments — CK (blank control group), CS (*Chilo. suppressalis* larvae), B1 (*B. bassiana* at 7.5×10^4 spores·mL⁻¹ + CS), B10 (7.5×10^5 spores·mL⁻¹ + CS), B100 (7.5×10^6 spores·mL⁻¹ + CS), B1000 (7.5×10^7 spores·mL⁻¹ + CS) and AE (acephate + CS). The results showed that *B. bassiana* stimulated the ammonification and nitrification of soils with maximum increases of 12.4% and 36.8%, respectively. Low concentration of *B. bassiana* facilitated denitrification, while high concentration inhibited denitrification. On the 10th day after treatment, acephate decreased ammonification, nitrification and denitrification rates by 18.6%, 45.3% and 27.5%, respectively. After inoculation with *C. suppressalis* and acephate application, ratios of AsA : DHA and GSH : GSSG reduced with decreasing antioxidant capacity. In contrast, *B. bassiana* treatment increased AsA : DHA and GSH : GSSG ratios. Changes in H₂O₂ content showed that *C. suppressalis* and acephate induced peroxidation, while *B. bassiana* reduced peroxidation intensity induced by *C. suppressalis*. Finally, *B. Bassiana* was not found in grains after RT-qPCR analysis. Overall, it was concluded that compared with chemical pesticide (acephate), *B. bassiana* was an effective and environment-friendly microbial pesticide.

Keywords *Beauveria bassiana*; Acephate; Rice; Redox state; Nitrification; Ammonification; Denitrification; Real-time PCR (Received Aug. 19, 2013; accepted Nov. 12, 2013)

随着社会的发展,传统化学农药对农业做出了巨大贡献,但农药的大规模使用导致了一系列社会问题和环境问题,如食品的农药残留、环境污染等对土壤微生物^[1-3]、植物、昆虫及其他非靶标生物^[4]造成危害等。因此,在评价及改良化学农药的同时,迫切需要利用生态学手段来开发较安全的生物农药,以解决这一问题^[5-6]。

白僵菌(*Beauveria bassiana*)是一种典型的杀昆虫真菌,作为一种微生物农药在全世界广泛使用^[7]。其能够毒杀 700 多种昆虫^[8],对多种土壤和植物病原菌具有拮抗作用^[9-10],能够与多种植物共生^[11-15]并能够诱导植物产生抗性。但是目前对于白僵菌施用后对植物及土壤环境的影响尚不清楚。

植物体内积累大量的活性氧会导致生物大分子的氧化损伤,造成对植物的伤害。抗坏血酸-谷胱甘肽循环(AsA-GSH 循环)是植物体内重要的抗氧化系统^[16],它通过 AsA : DHA (还原态抗坏血酸 : 氧化态抗坏血酸)、GSH : GSSG (还原态谷胱甘肽 : 氧化态谷胱甘肽)等维持细胞内的氧化还原环境,H₂O₂含量的变化反映了植物过氧化的积累程度,因此 AsA : DHA、GSH : GSSG 以及 H₂O₂ 可以用来评价外来环境变化对植物生理水平的影响。土壤氮化作用、硝化作用和反硝化作用对土壤氮循环至关重要,反映土壤的代谢活力,可以作为评价土壤代谢变化的指标。

水稻是我国乃至世界的主要粮食作物之一,而害虫如二化螟(*Chilo suppressalis*)等造成水稻大量减产。由于微生物农药白僵菌和化学农药乙酰甲胺磷对水稻害虫二化螟均具有毒杀作用,但其作用机制不同。因此我们通过在水稻上接种二化螟幼虫,并研究不同浓度白僵菌孢子悬液和化学农药乙酰甲胺磷处理对水稻氧化还原状态及土壤氮循环的影响,在同一体系中研究比较微生物农药和化学农药两种不同类型农药的生态功能。另外,白僵菌施用之后是否会通过水平传播进入到果实中从而影响粮食安

全也是值得探讨的。本文针对绿色荧光蛋白的一段序列设计引物,使用荧光定量 PCR 研究水稻稻谷中是否有白僵菌残留,综合评价微生物农药白僵菌的生态安全性,为其安全使用提供理论依据和参考。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试盆栽土壤取自南京师范大学植物园,土壤 pH 5.97,有机质 10.8 g·kg⁻¹,全氮 1.21 g·kg⁻¹,速效氮 98.64 mg·kg⁻¹,全磷 0.39 g·kg⁻¹,速效磷 24.67 mg·kg⁻¹,全钾 0.73 g·kg⁻¹,速效钾 67.58 mg·kg⁻¹。

供试水稻(*Oryza sativa*)品种为‘武育粳 D1’,购于江苏省农业科学院。二化螟幼虫由南京农业大学高建芬副教授赠送。白僵菌菌株 Bb0062(带有草丁膦抗性标记基因 *bar* 和表达绿色荧光蛋白基因 *egfp*)由西南大学裴炎教授赠送;将 PDA 平板上培养好的白僵菌刮取孢子并用无菌去离子水清洗然后制成不同浓度孢子悬液用于试验。供试化学农药为乙酰甲胺磷(Acephate),购于农药市场。

1.2 试验设计及样品采集

盆栽试验开展于南京师范大学植物园。共 7 个处理,每处理 6 次重复。各处理为:CK(空白)、CS(接种二化螟幼虫)、B1[白僵菌施用浓度 7.5×10^4 (孢子)·mL⁻¹]、B10[白僵菌施用浓度 7.5×10^5 (孢子)·mL⁻¹]、B100[白僵菌施用浓度 7.5×10^6 (孢子)·mL⁻¹]、B1000[白僵菌施用浓度 7.5×10^7 (孢子)·mL⁻¹]和 AE[乙酰甲胺磷,施用浓度为 2 mL(乳油)·L⁻¹(去离子水)],除空白处理外,其他处理均接水稻害虫二化螟幼虫(每桶 40 只)。盆栽桶高 70 cm,直径 30 cm,每桶含有过 2 mm 筛的土壤 20 kg。2012 年 5 月 1 日育苗,待幼苗长至 10~15 cm 时将其移栽至新桶中,每桶 4 穴。试验期间,视含水量浇灌自来水,并去除杂草。各处理用防虫网(3 m×0.7 m×1.5 m)遮盖。于 7 月 10 日接种二化螟幼虫并施用白僵菌和化学农药。

分别在喷施农药的第0 d、10 d、30 d、60 d, 用内径2 cm的土钻取0~5 cm深的混合土样, 并混匀进行土壤氮循环相关指标的测定。水稻叶片采集后去除叶脉, 取0.5 g单独进行叶片氧化还原状态的测定以及 H_2O_2 测定。

1.3 测定项目与方法

1.3.1 土壤氮循环相关的生物化学过程强度

测定不同处理条件下水稻土壤的氨化作用、硝化作用和反硝化作用强度指标, 测定方法见参考文献[17]。氨化作用强度的测定是通过向土壤中加入一定量的蛋白胨, 用康维微量扩散法测定氨化微生物培育后释放氨的量, 然后进行滴定, 以样品滴定值减去空白值即为待测液的值, 以土壤中氨的量表示土壤氨化作用强度。硝化作用强度的测定是利用培养基接种土壤悬液法, 硝化作用强度=(原始培养基中亚硝酸根的量-培养后培养基中亚硝酸根的量)/原始培养基中亚硝酸根的量 $\times 100\%$ 。反硝化作用强度的测定是利用硝酸盐消失法, 反硝化作用强度=(加入的硝态氮量-培育后剩余硝态氮量)/加入的硝态氮量 $\times 100\%$ 。

1.3.2 水稻叶片 GSH : GSSG、AsA : DHA 以及 H_2O_2 的测定

水稻叶片的 GSH、GSSG 和 H_2O_2 含量测定使用南京建成公司试剂盒, 并计算 GSH : GSSG。AsA 和 DHA 的测定见参考文献[18], 并计算 AsA : DHA。

1.3.3 白僵菌绿色荧光蛋白的引物设计

使用 Primer 5.0 设计引物(eGFP-F1/eGFP-R1)扩增标记白僵菌的绿色荧光蛋白的一段序列, PCR 产物为 289 bp。上下游引物序列分别是(eGFP-F1: 5' CAGTGTTCAGCCGCTACCC 3', eGFP-R1: 5'AGTTCACCTTGATGCCGTTCTT 3')

1.3.4 实时定量 PCR

使用 UltraClean™ Soil DNA Isolation 试剂盒(Mo BIO Laboratories)提取水稻稻谷DNA, 然后用1%的琼脂糖凝胶电泳检测。实时定量PCR扩增使用 Step One™(ABI, USA)定量PCR仪。采用梯度稀释的白僵菌基因组DNA为模板制作荧光定量标准曲线。25 μ L 的PCR扩增反应体系: 模板DNA(20 $ng \cdot \mu L^{-1}$) 2 μ L, 上下游引物各1 μ L, 10 μ L SYBR Premix Ex Taq, ROX 0.4 μ L, H_2O 6 μ L。扩增反应程序: 94 $^{\circ}C$ 5 min; 94 $^{\circ}C$ 30 s, 60 $^{\circ}C$ 50 s, 40 cycles。所有荧光定量PCR反应条件完全一致。

1.4 数据处理

试验结果用算术平均数 \pm 标准差表示, 应用 SPSS 13.0 软件进行方差分析, One-Way ANOVA 检验处理间差异显著性, 并用 Duncan 法进行多重比较, 当 $P \leq 0.05$ 时各处理间存在显著差异。使用 Excel

2007 作图。

2 结果与分析

2.1 不同处理对土壤氮循环相关生物化学过程强度的影响

由图 1A 可知, 整个试验周期中所有处理的氨化作用改变较少。但在处理后第 10 d 时, B1 处理可提高土壤氨化作用, 而 AE 处理的氨化作用强度比 CK 下降 18.6%。在第 30 d 时, AE 处理与 CK 一致, B1

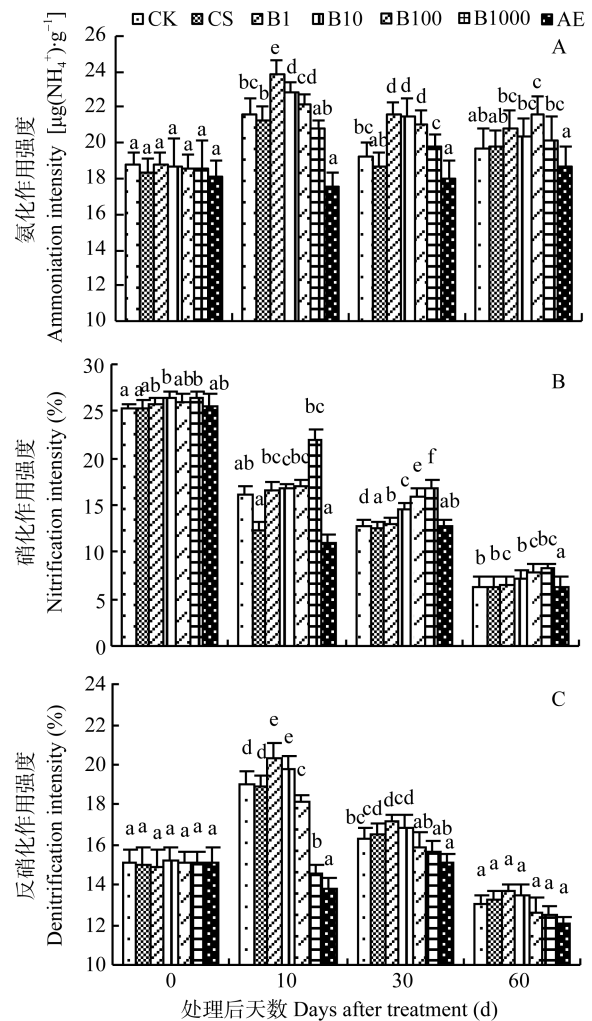


图 1 不同处理对水稻土壤氨化作用(A)、硝化作用(B)和反硝化作用(C)的影响

Fig. 1 Effects of different treatments on ammoniation (A), nitrification (B) and denitrification (C) intensities of paddy soil. CK: 空白对照; CS: 接种二化螟幼虫; B1: 二化螟幼虫+ 7.5×10^4 (孢子) $\cdot mL^{-1}$ (白僵菌); B10: 二化螟幼虫+ 7.5×10^5 (孢子) $\cdot mL^{-1}$ (白僵菌); B100: 二化螟幼虫+ 7.5×10^6 (孢子) $\cdot mL^{-1}$ (白僵菌); B1000: 二化螟幼虫+ 7.5×10^7 (孢子) $\cdot mL^{-1}$ (白僵菌); AE: 二化螟幼虫+为2 mL(乳油) $\cdot L^{-1}$ (去离子水)乙酰甲胺磷。不同字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$), 下同。CK is control; CS is treatment of inoculation of *Chilo suppressalis* larva; B1, B10, B100 and B1000 are treatments of application of 7.5×10^4 , 7.5×10^5 , 7.5×10^6 , and 7.5×10^7 spore $\cdot mL^{-1}$ *Beauveria bassiana* and inoculation of *Chilo suppressalis* larva. AE is treatment of 2 mL $\cdot L^{-1}$ acephate with inoculation of larva of *Chilo suppressalis*. Different letters indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$). The same below.

处理比 CK 提高 12.4%。在第 60 d 时, 各处理氨化作用强度趋于一致。可以看出白僵菌处理刺激了土壤氨化作用, 使氨化作用强度提高; 而乙酰甲胺磷能够降低土壤氨化作用; 二化螟处理的氨化作用与 CK 差异不显著, 其对土壤氨化作用没有显著影响。

由图 1B 可知, 在处理后的第 10 d 时, CS 和 AE 处理的土壤硝化作用强度比 CK 分别下降 22.86% 和 31.17%。在第 30 d 时, CS 和 AE 处理的硝化作用强度恢复到与 CK 一致, 而白僵菌处理的硝化作用强度随施用浓度的增加而增加, 其中 B1000 处理比 CK 提高 10.23%。

由图 1C 可知, 低浓度的白僵菌孢子悬液处理会提高土壤的反硝化作用, 而高浓度处理则抑制土壤反硝化作用。其中在第 10 d 时, B1000 和 AE 处理的反硝化作用强度比 CK 分别下降 23.5% 和 27.5%, 而 B1 处理则提高 6.6%。抑制作用在第 30 d 有所解除, 在第 60 d, 各处理的反硝化作用强度趋于一致。

2.2 不同处理对水稻氧化还原状态的影响

由图 2A 可知, 在处理后的第 10 d 时, B1 处理的 GSH : GSSG 比 CK 提高 34.8%, 在第 30 d 时, B100 处理比 CK 提高 51.8%, 而 CS 处理在第 10 d 和 30 d 较 CK 分别下降 45.02% 和 34.34%, AE 处理分别下降 25.72% 和 26.89%。

由图 2B 可知, 各处理 AsA : DHA 的变化趋势与 GSH : GSSG 类似。在第 10 d 和 30 d 时, B1 处理的 AsA : DHA 比 CK 分别提高 46.12% 和 17.64%, 而 CS 处理降低 33.43% 和 23.48%, AE 处理降低 36.08% 和 37.05%。

由图 2C 可知, 随着时间推移和植物的衰老, H₂O₂ 含量逐渐上升。白僵菌处理能够缓解过氧化, 而二化螟接种和化学农药的施加导致过氧化水平上升, 其中在第 30 d 时, AE 处理比 CK 提高 37.35%。在第 60 d 时, 各处理之间无显著差异。

2.3 荧光定量 PCR 检测白僵菌在水稻稻谷中的残留

2.3.1 白僵菌绿色荧光蛋白特异性引物设计及验证

通过对白僵菌绿色荧光蛋白序列的扩增效果及特异性验证筛选了一对引物 eGPF-F1 (5' CAGTGC TT CAGCCGCTACCC 3'), eGFP-R1 (5' AGTTCACCT TGATGCCGTTCTT 3')。由图 3 可以看出, 使用 eGPF-F1/eGFP-R1 进行常规 PCR 反应, 可以得到大小为 289 bp 的单一扩增条带。

2.3.2 白僵菌定量 PCR 标准曲线制备

使用梯度稀释的白僵菌基因组 DNA 做为模板, eGPF-F1/eGFP-R1 为引物绘制白僵菌基因组荧光定量标准曲线(图 4), 横坐标(x)为模板质量, 纵坐标(y)为达到荧光阈值的循环数(Ct 值), 相关系数(R²>0.99)。

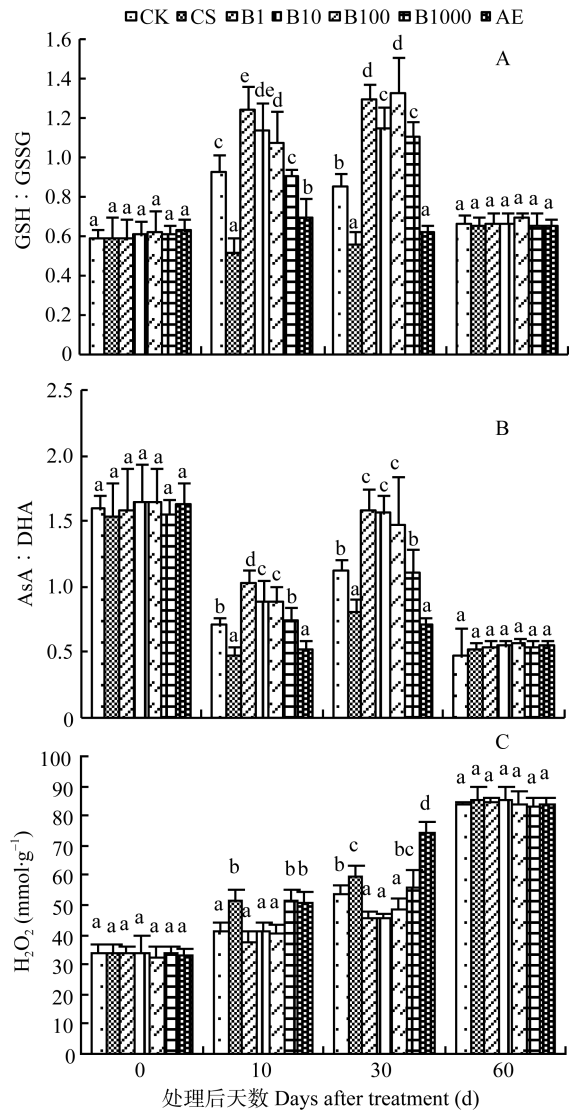


图 2 不同处理对水稻 GSH : GSSG(A)、AsA : DHA(B) 和 H₂O₂(C) 含量的影响

Fig. 2 Effects of different treatments on GSH : GSSG(A), AsA : DHA(B) and H₂O₂(C) content of paddy

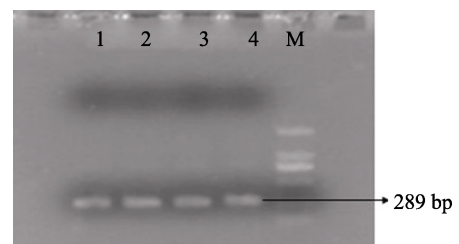


图 3 引物 eGPF-F1/eGFP-R1 的扩增产物

Fig. 3 PCR products using primer eGPF-F1/eGFP-R1

1、2、3 和 4 表示白僵菌基因组的 PCR 产物, M 表示 Marker (DL 2000). 1, 2, 3 and 4 stand for the PCR products of *B. bassiana*, M stand for marker (DL 2000).

同时, 将白僵菌基因组 DNA 继续稀释至 10⁻² pg、10⁻³ pg、10⁻⁴ pg、10⁻⁵ pg、10⁻⁶ pg, 用 1 μL 超纯无菌水作对照进行扩增, 研究该方法的检测极限, 1 fg·μL⁻¹ 白僵菌基因组 DNA 为模板及 1 μL 超纯无菌水代替 DNA

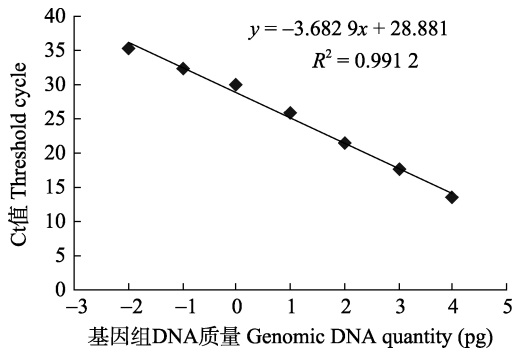


图 4 白僵菌基因组实时荧光定量 PCR 标准曲线

Fig. 4 Standard curve from real time PCR amplified with *B. bassiana* genomic DNA

模板作为阴性对照均未能扩增,表明该体系的检测白僵菌基因组DNA质量的下限为 $10 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

2.3.3 水稻稻谷白僵菌残留检测

在收获稻谷后,从 B1、B10、B100、B1000 4 个处理中分别提取稻谷总 DNA 并进行荧光定量 PCR,结果在所有处理中均未检测到白僵菌的存在,说明白僵菌在水稻稻谷中无残留。

3 讨论与结论

氨化作用、硝化作用及反硝化作用反映了土壤的氮循环能力。Gigliotti等^[19]发现苯噻磺隆降低了稻田的硝化作用;Lang等^[20]研究了百菌清和多菌灵对几种土壤的硝化作用和反硝化作用的影响,结果表明百菌清对稻田土壤的硝化作用有毒害作用;Martínez-Toledo等^[21]研究表明农药会抑制硝化细菌的生长。在本研究中,白僵菌处理对土壤的3种生物化学过程强度影响较小,而化学农药处理能够抑制硝化作用及反硝化作用。因此推测,一方面由于农药施入后直接影响到土壤氮循环相关微生物群落,另一方面是农药施加影响了植物生长,改变了植物根系分泌物等,从而间接改变了土壤与氮循环相关的生物化学强度。

非生物胁迫与病原害虫侵染会通过增加活性氧的合成而引起植物氧胁迫。高浓度的活性氧会激发细胞损伤及凋亡。为了避免这些损伤,植物进化出相应的酶系及非酶系的抗氧化机制以清除活性氧。AsA 和 GSH 是主要的小分子抗氧化化合物,在细胞防御氧胁迫损伤时起重要作用。生防菌诱导植物面对胁迫的耐受性,防御害虫以及提高植物抗性的能力与生防菌能提高植物的 AsA : DHA 和 GSH : GSSG 相关^[22]。本文研究了白僵菌和化学农药施加后接种二化螟的水稻叶片的氧化还原状态。在接种二化螟和施加化学农药后,AsA : DHA 和 GSH : GSSG 降低,即还原态 : 氧化态比例^[23]的降低,这说明二化螟和化学农药引起了有害的氧胁迫。数据

显示,白僵菌处理能够提高 AsA : DHA 和 GSH : GSSG,消除二化螟感染引起的水稻叶片过氧化的负面影响。

受到氧胁迫的活组织会发生过氧化。本试验表明,农药施加和二化螟感染水稻叶片导致 H_2O_2 含量增加,说明农药胁迫和害虫胁迫会导致过氧化,此观察与还原态 : 氧化态变化结果一致。本文也发现白僵菌能削弱二化螟诱导的 H_2O_2 积累。Harrach 等^[22]研究表明,病原菌镰刀菌(*Fusarium culmorum*)会抑制大麦植物根部的抗氧化活力,从而造成 H_2O_2 积累和还原态 : 氧化态下降,而生防菌印度梨形孢(*Piriformospora indica*)完全阻止了镰刀菌诱导的抗氧化能力的损伤,激活植物抗氧化系统来保护植物。在本研究中白僵菌也有类似作用。

以上结果说明白僵菌可通过激活宿主抗氧化系统来保护植株。保镖假说^[23]认为:植物进化出一种机制,即对害虫的天敌具有偏好性,从而保护自己免受伤害。这应该是植物的一种进化优势。Ownley 和 Windham^[24]认为,植物在受到害虫侵害后会产生挥发性物质(信息素),从而引诱并促进一些杀害虫真菌的存活、生长及对害虫进行毒杀。在本研究中,推测白僵菌诱导了水稻的系统抗性,从而触发植物防御病原菌和害虫;另一方面,白僵菌本身也可以拮抗植物病原菌和毒杀二化螟害虫,从而改善植物的生长状态。Griffin 和 Leckie 研究^[25-26]表明,使用浸种方式可以从棉花和西红柿幼苗的根、茎、叶中分离出白僵菌。本研究还发现在稻谷中并无白僵菌残留,推测白僵菌不能通过水平传播进入到稻谷中,然而在其他作物中是否有此现象还不清楚。

研究表明,白僵菌对土壤氮循环影响较小,而乙酰甲胺磷具有一定的影响。白僵菌施加后能够提高水稻的抗氧化能力,而接种害虫和施加乙酰甲胺磷导致过氧化程度增加。说明在此水稻体系中,白僵菌与乙酰甲胺磷相比,是一种环境友好型生物农药。为了深入理解及评价白僵菌施用后的生态安全性,在未来研究中应涉及更多土壤类型和植物种类,从而得出较全面和深入的评价,进一步揭示白僵菌在环境中的生态功能,使其为农业生产和林业保护提供更好的服务。

致谢 衷心感谢西南大学生物技术中心裴炎教授提供绿色荧光蛋白标记的白僵菌菌种,也衷心感谢南京农业大学植物保护学院高建芬副教授提供二化螟幼虫。

参考文献

- [1] Monkiedje A, Spiteller M. Effects of the phenylamide

- fungicides, mefenoxam and metalaxyl, on the microbiological properties of a sandy loam and a sandy clay soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2002, 35(6): 393–398
- [2] Monkiedje A, Ilori M O, Spiteller M. Soil quality changes resulting from the application of the fungicides mefenoxam and metalaxyl to a sandy loam soil[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2002, 34(12): 1939–1948
- [3] Lupwayi N Z, Brandt S A, Harker K N, et al. Contrasting soil microbial responses to fertilizers and herbicides in a canola-barley rotation[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2010, 42(11): 1997–2004
- [4] 吴春华, 陈欣. 农药对农区生物多样性的影响[J]. *应用生态学报*, 2004, 15(2): 341–344
Wu C H, Chen X. Impact of pesticides on biodiversity in agricultural areas[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2004, 15(2): 341–344
- [5] Gurr G M, Wratten S D, Altieri M A. Ecological engineering: A new direction for agricultural pest management[J]. *Australasian Farm Business Management Journal*, 2004, 1(1): 28–35
- [6] Gurr G M, Wratten S D, Altieri M A. *Ecological Engineering for Pest Management: Advances in Habitat Manipulation for Arthropods*[M]. Melbourne, Australia: Csiro Publishing, 2004
- [7] Ownley B H, Griffin M R, Klingeman W E, et al. *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2008, 98(3): 267–270
- [8] Meyling N V, Eilenberg J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control[J]. *Biological Control*, 2007, 43(2): 145–155
- [9] Bark Y G, Lee D G, Kang S C, et al. Antibiotic properties of an entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, on *Fusarium oxysporum* and *Botrytis cinerea*[J]. *Korean Journal of Plant Pathology*, 1996, 12(2): 245–250
- [10] Vega F E, Simpkins A, Catherine Aime M, et al. Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico[J]. *Fungal Ecology*, 2010, 3(3): 122–138
- [11] Posada F, Vega F E. Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (*Theobroma cacao*)[J]. *Mycologia*, 2005, 97(6): 1195–2000
- [12] Posada F, Vega F E. Inoculation and colonization of coffee seedlings (*Coffea arabica* L.) with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales)[J]. *Mycoscience*, 2006, 47(5): 284–289
- [13] Wagner B L, Lewis L C. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(8): 3468–3473
- [14] Ganley R J, Newcombe G. Fungal endophytes in seeds and needles of *Pinus monticola*[J]. *Mycological Research*, 2006, 110(3): 318–327
- [15] Gómez-Vidal S, Lopez Llorca L V, Jansson H B, et al. Endophytic colonization of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) leaves by entomopathogenic fungi[J]. *Micron*, 2006, 37(7): 624–632
- [16] Ken'ichi O. Glutathione-associated regulation of plant growth and stress responses[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2005, 7(7/8): 973–981
- [17] 林先贵. *土壤微生物研究原理与方法*[M]. 北京: 高等教育出版社, 2010
Lin X G. *Principles and Methods of Soil Microbiology Research*[M]. Beijing: Higher Education Press, 2010
- [18] Foyer C H, Halliwell B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism[J]. *Planta*, 1976, 133(1): 21–25
- [19] Gigliotti C, Allievi L. Differential effects of the herbicides bensulfuron and cinosulfuron on soil microorganisms[J]. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 2001, 36(6): 775–782
- [20] Lang M, Cai Z C. Effects of chlorothalonil and carbendazim on nitrification and denitrification in soils[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2009, 21(4): 458–467
- [21] Martínez-Toledo M V, Samerón V, Rodelas B, et al. Effects of the fungicide captan on some functional groups of soil microflora[J]. *Applied Soil Ecology*, 1998, 7(3): 245–255
- [22] Harrach B D, Baltruschat H, Barna B, et al. The mutualistic fungus *Piriformospora indica* protects barley roots from a loss of antioxidant capacity caused by the necrotrophic pathogen *Fusarium culmorum*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2013, 26(5): 599–605
- [23] Elliot S, Sabelis M, Janssen A, et al. Can plants use entomopathogens as bodyguards?[J]. *Ecology Letters*, 2000, 3(3): 228–235
- [24] Ownley B H, Windham M. *Biological control of plant pathogens*[M]//Trigiano R N, Windham M T, Windham A S (Eds). *Plant Pathology: Concepts and Laboratory Exercises*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2007: 424–436
- [25] Griffin M R. *Beauveria bassiana*, a cotton endophyte with biocontrol activity against seeding disease[D]. The Knoxville: University of Tennessee, 2007
- [26] Leckie B M. Effects of *Beauveria bassiana* mycelia and metabolites incorporated into synthetic diet and fed to larval *Helicoverpa zea*; and detection of endophytic *Beauveria bassiana* in tomato plants using PCR and ITS primers[D]. Knoxville: University of Tennessee, 2002