

几种植物病原真菌在蜂蜜及蜜蜂体表中的存活与凋亡

方妍*, 曾梅婷, 魏健民, 李雪生#

广西大学农学院, 广西 南宁

收稿日期: *****

摘要

目的: 蜜蜂采蜜过程中可能会在食物及体表沾染上植物病原真菌, 本实验主要探讨蜜蜂采蜜过程中接触到的病原真菌能否在蜂蜜及蜜蜂体表中存活, 评价病原菌通过采蜜行为进行传播的风险。方法: 选取9种不同植物病害的病原真菌, 将病原真菌接种于蜂蜜培养基上培养, 记录病原真菌的生长情况及存活时间。并将病原真菌接种于蜜蜂花粉足后接种于PDA培养基培养, 记录病原真菌在蜜蜂体表的存活情况及存活时间。结果: 9种菌种在蜂蜜培养基内均无法生长, 菌丝枯萎死亡。9种试验病原真菌在蜜蜂花粉足中也无法存在, 病原真菌在蜂蜜中存活时间因种属差异而不同, 在蜜蜂体表能存活3~7天。结论: 病原真菌无法在纯蜂蜜基质中进行繁殖, 但可在蜂蜜内及蜜蜂体表上存活一定的时间, 有可能通过蜜蜂的食物传递过程或传粉、采蜜行为进行传播。

关键词

蜜蜂, 蜂蜜, 植物病原真菌, 存活

Survival and Apoptosis of Several Plant Pathogenic Fungi on Honey and the Body Surface of Bees

Yan Fang*, Meiting Zeng, Jianmin Wei, Xuesheng Li#

College of Agriculture, Guangxi University, Nanning Guangxi

Received: *****

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 方妍, 曾梅婷, 魏健民, 李雪生. 几种植物病原真菌在蜂蜜及蜜蜂体表中的存活与凋亡[J]. 农业科学, 2023, 13(9): 830-839. DOI: 10.12677/hjas.2023.139117

Abstract

Objectives: Bees may be infected with plant pathogenic fungi during the honey picking process. This experiment mainly explores whether the pathogenic fungi that bees come into contact with during the honey picking process can survive in the honey and bee body surface, and assesses the risk of pathogen transmission through honey-gathering behavior. **Method:** Nine different plant pathogenic fungi were selected and inoculated on honey agar medium for cultivation. The growth and survival time of the pathogenic fungi were recorded. The pathogenic fungi were also inoculated on honey bee pollen and cultivated on PDA medium, recording the viability and survival time of pathogenic fungi on the surface of honey bees. **Results:** None of the nine fungal species were able to grow on the honey agar medium, and the fungal mycelium withered and died. The nine tested pathogenic fungi were not present on the honey bee pollen, and the survival time in honey varied due to species differences, while they could survive on the surface of honey bees for 3 to 7 days. **Conclusion:** Pathogenic fungi cannot reproduce in pure honey substrate, but they can survive for a certain period of time in honey and on the body surface of honey bees. It is possible for them to be transmitted through the honey bee's food transfer process or through pollination and honey-gathering behavior.

Keywords

Honeybee, Honey, Plant Pathogen, Survival

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

在昆虫纲中,传粉昆虫主要分布于4个目,包括双翅目、鞘翅目、鳞翅目和膜翅目。而膜翅目的蜜蜂总科则被认为是自然界中最重要的传粉昆虫,蜜蜂授粉在保障作物生产、农业可持续发展中具有不可替代的作用。经过长期的进化和发展,蜜蜂形成了许多特化器官(如携粉足和嚼吸式口器)和严格的社会性行为,使其成为自然界中理想的传粉昆虫。蜜蜂中足胫节末端有一个刺状突起物,通常被称为“距”或“花粉铲”,可将花粉团铲到巢孔内[1]。过去的研究证实,蜜蜂具有强大的携带花粉颗粒能力,一只蜜蜂周身的绒毛间可携带花粉500余万粒[2],即使经过刷洗之后仍有2万粒以上的花粉黏附在绒毛上。蜜蜂的食物主要为蜂蜜和花粉。在蜂群内部有着严格的食物传递行为,食物多由工蜂传递给蜂王、雄蜂,以及在工蜂之间相互传递[3],这种行为多由乞食动作引发。食物提供者接受到乞食信息后,便张开上颚从蜜囊中吐出蜂蜜于一对上颚之间,乞食蜜蜂用口喙在对方上颚间吮吸。蜂源性植物分布广泛,目前已明确的主要蜂源性植物约有30种,这些蜜源植物包括人类已规模化种植及自然状态生长的植物种类,蜜源植物与其它植物一样,生长过程中不可避免地遭受各种各样的植物病原危害,包括对蜜蜂采蜜的主要器官植物花朵的侵染危害,蜜蜂采蜜过程当中也就不可避免地接触到各种各样的植物病原菌[4]。目前,对于蜜蜂采蜜过程中接触到的植物病原菌能否在蜜蜂食物及体表中存活,以及是否会通过蜜蜂的采蜜、种群食物传递行为进行扩散和传播未见报道[5]。本试验选取了多种不同蜜

源植物病害的病原真菌，通过将病原真菌分别接种于蜂蜜培养基、蜜蜂花粉足培养后接种于 PDA 培养基再培养，研究植物病原真菌在蜂蜜及蜜蜂体表上的存活情况。探究蜜蜂采蜜及交哺交育行为造成植物病害的传播及扩散的风险。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

2.1.1. 材料

病原真菌：取自广西大学农学院微生物实验室纯化培养的白兰炭疽菌(*Colletotrichum orchidearum* Allesch f. *Cymbidii* Allesch)、苦瓜枯萎病尖镰孢菌(*Fusarium oxysporum* f.sp. *momordicae* Sun et Huang)、烟草链格孢(*Alternaria nicotiana* Cheng et An)、水稻纹枯病立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* Kühn) 4 种真菌，以及取自广西农科院生物所培养的石榴果白二轮蓝状菌(*Talaromyces abobiverticillius*)、香蕉枯萎病尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*)、香蕉炭疽病芭蕉炭疽菌(*Gloeosporium musarum* Cooke et Mass)、百香果果腐病可可毛色二孢(*Lasiodiplodia theobromae*)、白绢病齐整小核菌(*Sclerotium rolfsii* Sacc) 5 种真菌。

供试虫源：广西大学农学院昆虫研究所人工饲养意大利蜜蜂种群。

2.1.2. 培养基

马铃薯琼脂培养基(PDA)；蜂蜜培养基：采用市售纯蜂蜜，吸取 10 mL 蜂蜜于培养皿内中缓慢摇匀形成。

2.2. 实验方法

2.2.1. 蜜蜂养殖

从蜂箱中随机取出一定数量的蜜蜂，装于一次性塑料碗内，向碗内通入适量 CO₂，致使蜜蜂暂时性昏厥。将蜜蜂按所接病原真菌分为 11 组，每组 10 只分装于对应的碗中，并用纱布罩于其上，放置于常温环境保证光照进行培养[6]。为保证蜜蜂存活，需定时在纱布上放置注入一定糖水蘸湿的棉花(白砂糖与水 1:1 混合配制)。

2.2.2. 病原真菌移植

试验用病原真菌的繁育：用左手握持病原真菌菌种试管，用右手执移植针并在火焰上灭菌消毒，用右手的小指和无名指旋开菌种试管棉塞，将冷却后的移植针伸进试管用针头挑取一小块菌丝，转入新的 PDA 平板培养基上，盖上皿盖放置光照培养箱培养，获得试验用的健康纯净病原真菌菌株待用。

在超净工作台上打开菌种生长良好的培养器皿，右手执打孔器(6 mm)并在火焰上灭菌，用打孔器在菌种培养基上打孔，打孔不同的菌种前，打孔器均需完全灭菌并冷却。打孔结束后，使用接种环把环状菌种移植到 PDA 平板培养基和蜂蜜培养基中培养。在每个 PDA 培养基或蜂蜜培养基内放置两种不同的菌种，每个菌种设 2 个点。并设置不接菌的纯 PDA 培养基和纯蜂蜜培养基作为对照组，观察菌落的生长情况。观察 6 天，记录菌落的直径、菌落生命活力等。

2.2.3. 不同真菌在蜂蜜培养基内的生长情况

每个 PDA 培养基和蜂蜜培养基中移植 2 个不同的病原菌种。并设置纯 PDA 培养基和纯蜂蜜培养基作为对照组。连续 6 天观察菌落在蜂蜜培养基内的生长状态，与 PDA 培养基(CK 组)内生长的菌落比对，记录菌落的直径，评价真菌生长状况及活性差异。

2.2.4. 不同病原真菌在蜂蜜培养基内的存活时间

把蘸取菌种孢子液的滤纸片放置蜂蜜培养基内培养, 分别培养 1 d、3 d、7 d 后移入 PDA 培养基内培养, 观察菌落生长状况及活性。同时设置纯蜂蜜培养基和 PDA 培养基作对照组。评价病原菌在蜂蜜基质中的存在时间。

2.2.5. 不同病原真菌在蜜蜂体表的存活试验

对照组 1 (CK1): 自然种群蜜蜂中各取出 3 只蜜蜂剪取花粉足酒精消毒后置于 PDA 培养基中, 37℃ 条件下培养 24~48 h, 观察未进行接菌的自然种群蜜蜂花粉足在消毒后在培养皿中菌落的生长情况。判别消毒后自然种群蜜蜂是否还携带有试验用的菌株而干扰试验。

对照组 2 (CK2): 自然种群蜜蜂中各取出 3 只蜜蜂剪下花粉足但不消毒, 进行同 CK1 的培养, 观察未进行接菌的蜜蜂花粉足不经消毒后的菌落生长情况, 判别自然种群蜜蜂是否携带有试验用的菌株而干扰试验。

接触病原菌的实验组: 将每一组取出的蜜蜂进行 CO₂ 通气处理, 在蜜蜂暂时性昏厥的情况下, 将蜜蜂花粉足先放置于酒精中进行消毒, 以保证无杂菌干扰, 再将活体蜜蜂与此前准备好的病菌培养皿进行接触 15 min, 使其花粉足接触足够量的病原菌后移出继续饲养。在接触菌种 1 天后, 利用 CO₂ 使实验对象昏厥, 从各组中取出 3 只蜜蜂将花粉足剪下分别移至 PDA 培养基中, 37℃ 条件下培养 24~48 h, 观察培养皿中菌落的生长情况。在接触菌种的第 3 天和第 7 天进行同样的操作, 同样记录菌落生长情况, 与 CK1、CK2 进行对比, 考查病原菌在蜜蜂体表中的存活时间及活力。

2.3. 数据处理

采用 Excel 2010 软件进行数据处理, 使用 SPSS 23.0 软件进行数据方差分析, 使用 Excel 2010 软件进行图表分析。

3. 结果与分析

3.1. 不同真菌菌种在蜂蜜培养基内的生长情况

为了调查不同菌种在蜂蜜培养基内的生长情况, 在每个培养基内设置了两个不同的菌, 每个菌种设 2 个点。观察真菌菌落在蜂蜜培养基内的生长状态, 以在 PDA 培养基(CK 组)内生长的菌落为对照, 记录菌落的直径。

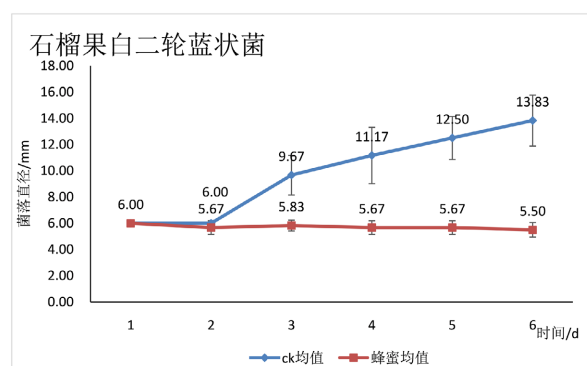
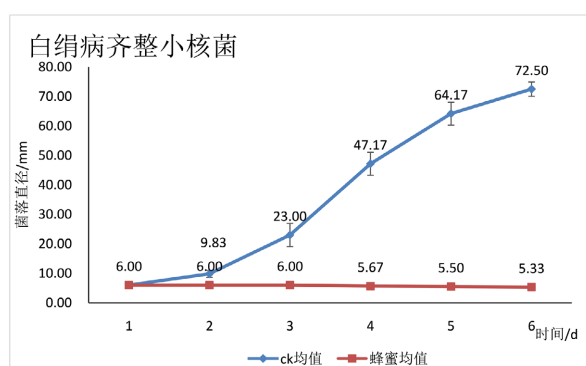
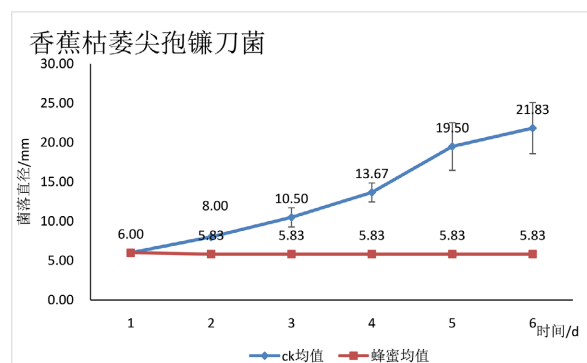
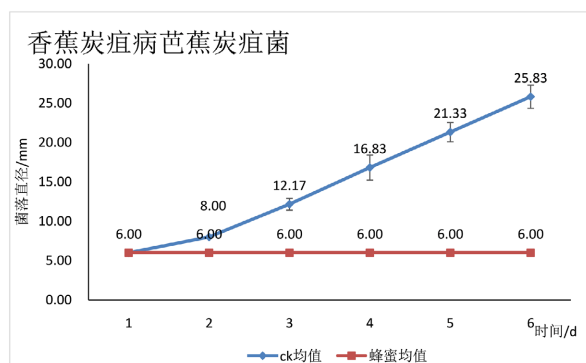
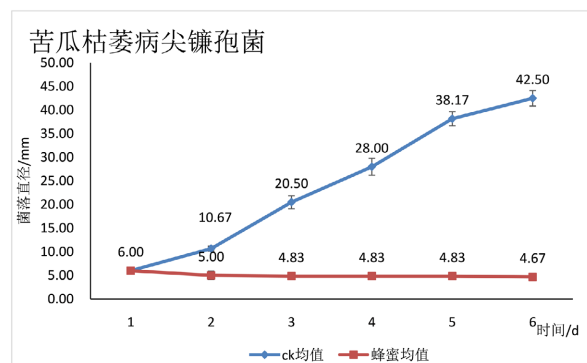
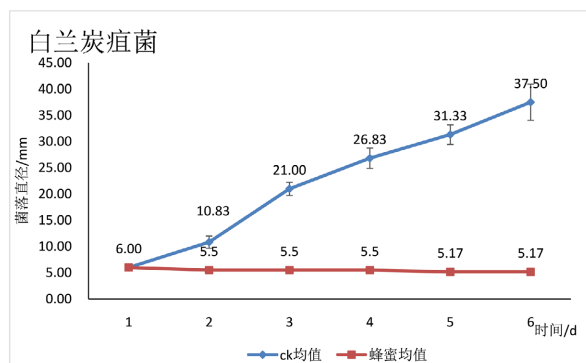
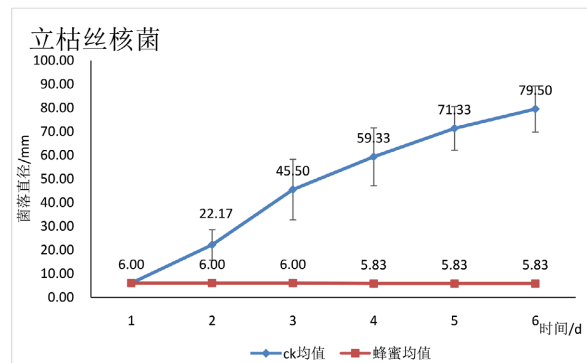
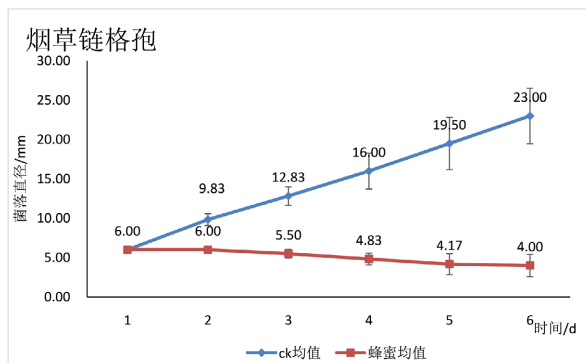
试验结果如图 1 所示, 通过对菌落生长进行分析, 在 PDA 培养基中, 试验的 9 种菌种均具有良好的生命活力, 菌落直径均值由接种时的 6 mm, 在培养 6 d 后可生长至 13.83~79.50 mm, 菌落直径均显著扩大, 生长较慢的为石榴果白二轮蓝状菌, 生长最快的为立枯丝核菌。而在蜂蜜培养基中, 9 种菌种在培养 6 天内菌落直径均为初始接种时的 6 mm, 菌落无明显生长扩繁现象, 初始接种的菌斑(6 mm)也出现明显萎缩, 菌落直径均变小, 且菌落边缘的菌丝有死亡现象, 菌植无生命力。

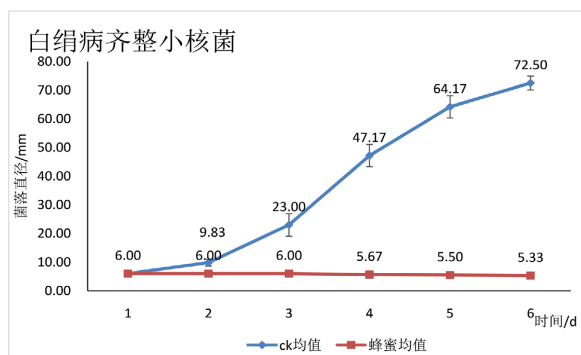
我们的试验结果表明, 9 种不同试验菌种在常规 PDA 培养基中均能正常生长, 但在蜂蜜培养基中均无生命活性, 6 天内逐渐萎缩。

3.2. 不同真菌菌种在蜂蜜培养基中的存活时间

用直径 6 mm 的圆形滤纸片蘸取菌种的孢子液, 把滤纸片放置蜂蜜培养基内培养。分别培养 1 d、3 d、7 d 后移出至 PDA 培养基内培养, 观察滤纸片上是否有菌落生长。以蘸取菌种的滤纸片直接在 PDA 培养基(CK 组)内培养为对照, 比较分析真菌菌种在蜂蜜培养基中的存活时间。如在蜂蜜中培养 1 d 后

移植至 PDA 不出现菌落生长的病原菌株将不再移植蜂蜜中培养 3 d 及 7 d 菌株进行 PDA 培养, 类似的, 如在蜂蜜中培养 3 d 后移植至 PDA 不出现菌落生长的病原菌株将不再移植蜂蜜中培养 7 d 菌株进行 PDA 培养。



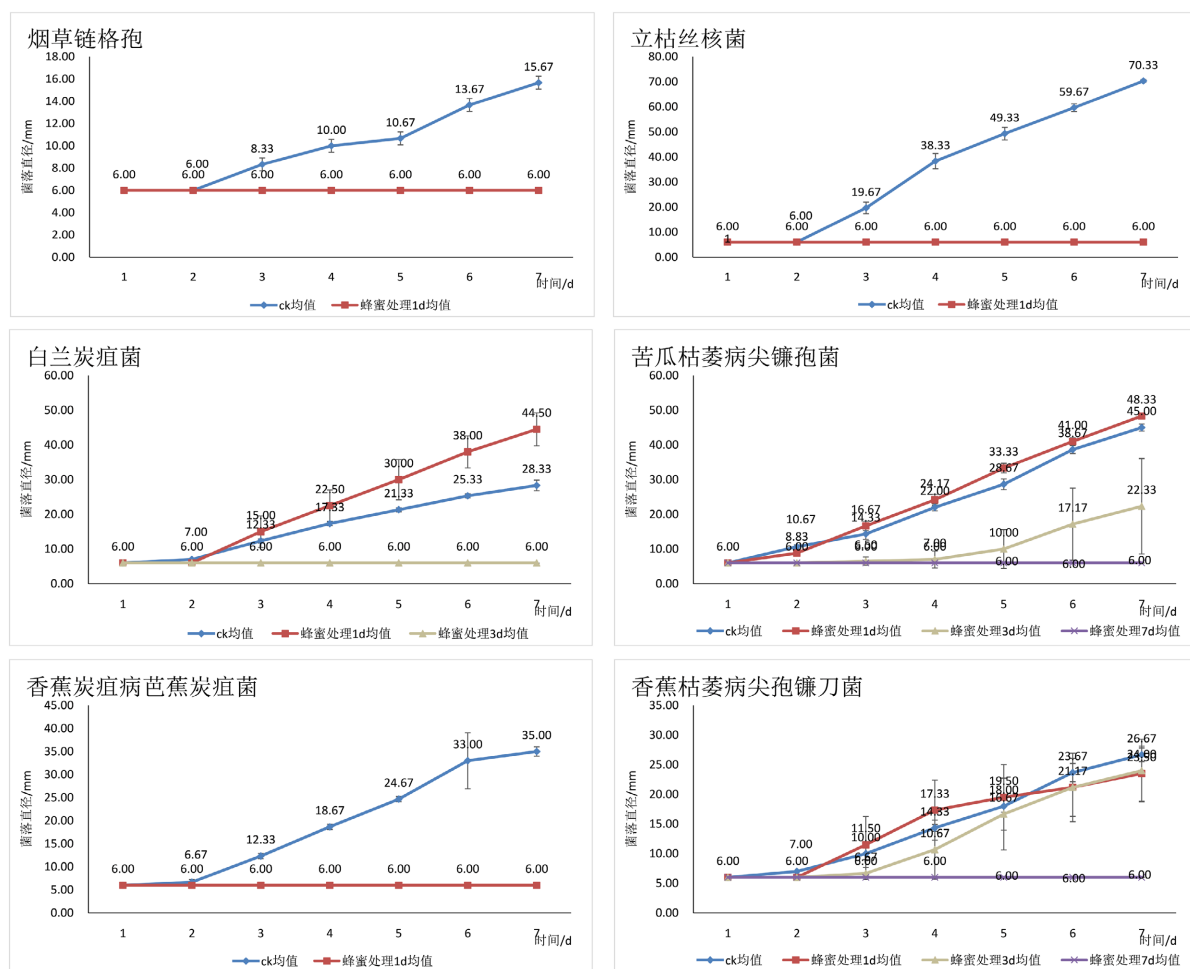


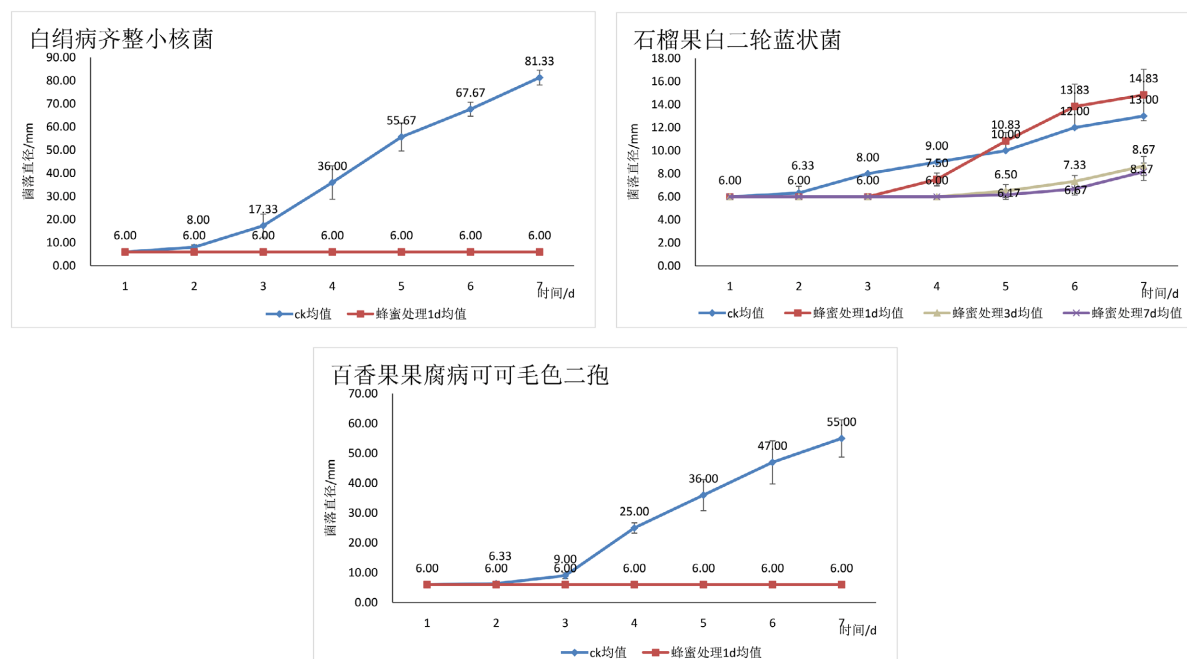
注：图中数值代表菌落平均直径，CK 均值表示在 PDA 培养基内培养，蜂蜜均值表示在蜂蜜培养基中培养。

Figure 1. Colony growth of different bacterial strains in honey culture medium and PDA culture medium

图 1. 不同菌种在蜂蜜培养基及 PDA 培养基中的菌落生长情况

通过对菌落的生长情况分析，如图 2 所示。可明显看出，在蜂蜜培养基中培养 1 d 后移至 PDA 培养基内再培养，烟草链格孢菌、立枯丝核菌、芭蕉炭疽菌、果腐病可可毛色二孢菌、齐整小核菌的菌落直径均值维持在 6 mm，无新菌落长出，菌丝及孢子无生命活力。白兰炭疽菌、尖镰孢菌、尖孢镰刀菌、白二轮蓝状菌菌落直径均扩大，菌落有明显活力。因此，将在蜜蜂中培养 3 d 的白兰炭疽菌、尖镰孢菌、尖孢镰刀菌、白二轮蓝状菌进行移植至 PDA 中培养，而其它无生命活力的菌株将不再移植培养。





注：图中数值代表菌落直径平均值，“CK 均值”表示在 PDA 培养基内培养，“蜂蜜处理 1 d、3 d、7 d 均值”分别表示在蜂蜜培养基中培养 1 d、3 d、7 d 后移出至 PDA 培养基内培养。

Figure 2. Growth of different pathogenic bacteria inoculated into PDA after cultivation in honey culture medium
图 2. 不同病原菌经蜂蜜培养基培养后接种于 PDA 内的生长情况

在蜂蜜培养基中培养 3 d 后再转移至 PDA 培养的白兰炭疽菌菌落直径均值不变，菌丝及孢子无生命活力；尖镰孢菌、尖孢镰刀菌、白二轮蓝状菌菌落直径均继续扩大，生命力良好。在蜂蜜中培养 7 d 后再将尖镰孢菌、尖孢镰刀菌、白二轮蓝状菌转移至 PDA 中培养，尖镰孢菌、尖孢镰刀菌菌落直径均值不变，并无新菌落长出，菌丝及孢子失去生命活力，而白二轮蓝状菌菌落直径有较小扩大，菌丝及孢子经蜂蜜培养基培养 7 d 后仍具有生命活力。

结果表明，在蜂蜜培养基中，病原真菌存活时间因种属差异而不同，存活时间在 1 d 内的为烟草链格孢菌、水稻纹枯病立枯丝核菌、香蕉炭疽病芭蕉炭疽菌、百香果果腐病可可毛色二孢、白绢病齐整小核菌；存活时间在 1~3 d 内的为白兰炭疽菌；存活时间在 3~7 d 内的为苦瓜枯萎病尖镰孢菌、香蕉枯萎病尖孢镰刀菌；存活时间超过 7 d 的为石榴果白二轮蓝状菌。

3.3. 不同病原真菌在蜜蜂体表中的存活试验

将未进行接菌的蜜蜂花粉足分为两组，一组进行消毒处理(CK1)，一组不进行消毒处理(CK2)，分别置于 PDA 培养基中，37℃ 条件下培养 24~48 h，分别培养皿中菌落的生长情况。结果表明，CK1 组菌落直径均保持为 0 mm，无菌落长成，说明将花粉足进行消毒后移至培养皿中无菌落生长，不产生干扰菌落，经消毒后蜜蜂花粉足中无杂菌污染。CK2 组菌落直径随时间递增，即有杂菌落长成，但无试验目标菌生长，没有对花粉足进行消毒移至 PDA 中培养将产生菌落干扰。

在蜜蜂暂时性昏厥的情况下，将蜜蜂花粉足先放置于酒精中进行消毒，再将活体蜜蜂与此前准备好的病菌培养皿进行接触 15 min 后移出培养皿继续饲养。在蜜蜂分别接触菌种 1 d、3 d、7 d 后，从各组中取出 3 只将花粉足剪下分别移至 PDA 培养基中，37℃ 条件下培养 24~48 h，观察培养皿中菌落的生长情况。

数据结果如图 3、图 4、图 5 所示，将与病菌接触后 1 天以及 3 天的蜜蜂的花粉足移至 PDA 培养基上培养，均能够得到具有生长能力的菌落，试验病原真菌仍具较强生长能力。对比长成的菌落特征，可以确定所得菌落与纯单菌落相同；对比菌落直径发现，其生长能力有明显减弱，说明贴附于蜜蜂花粉足中的病原菌随时间延长其生命力减弱，接触 7 天的病菌培养基中无明显菌落，说明病菌已凋亡。

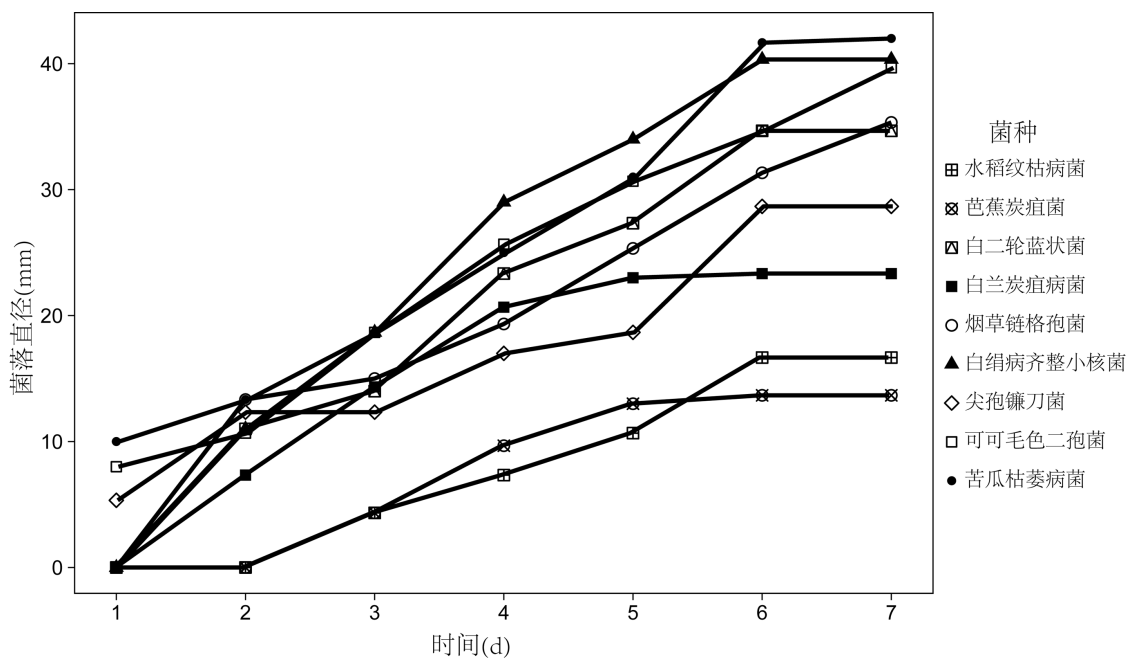


Figure 3. Growth of bee pollen foot on PDA medium after 1-day exposure to pathogenic bacteria

图 3. 接触病原菌 1 d 蜜蜂花粉足在 PDA 培养基上的生长情况

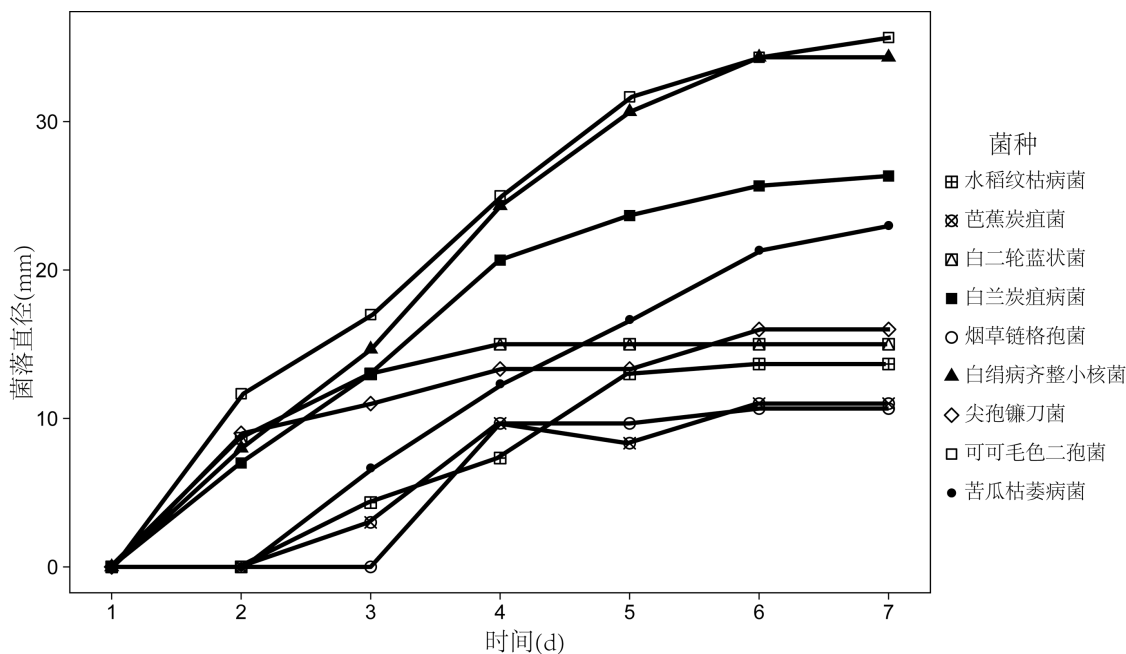


Figure 4. Growth of bee pollen foot on PDA medium after 3-day exposure to pathogenic bacteria

图 4. 接触病原菌 3 d 蜜蜂花粉足在 PDA 培养基上的生长情况

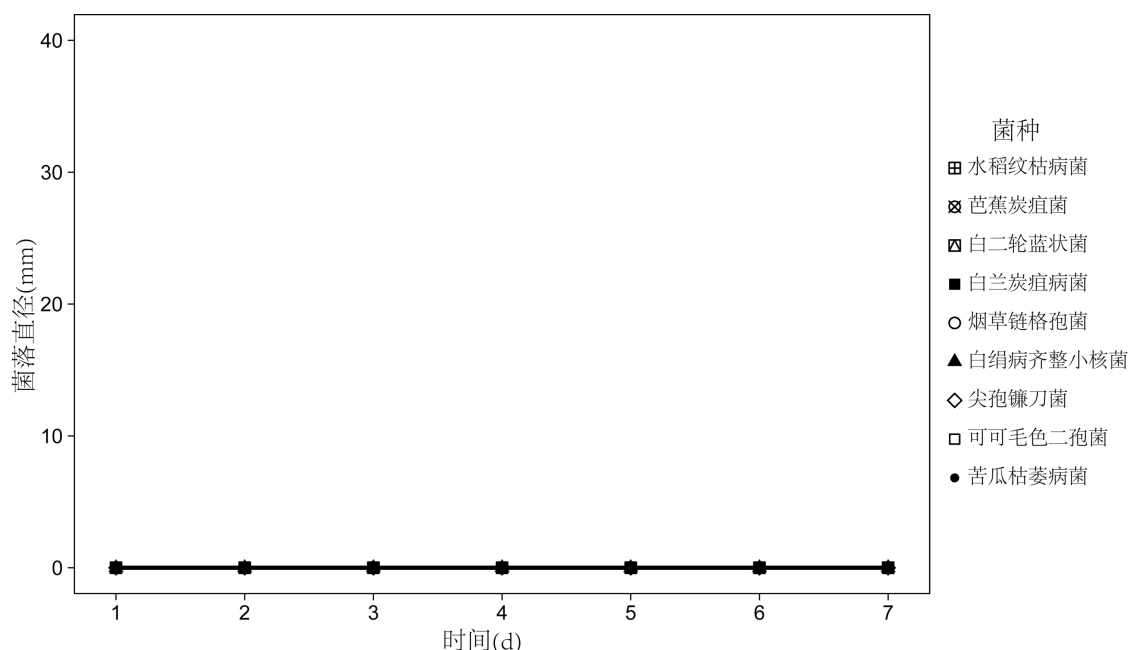


Figure 5. Growth of bee pollen foot on PDA medium after 7-day exposure to pathogenic bacteria
图 5. 接触病原菌 7 d 蜜蜂花粉足在 PDA 培养基上的生长情况

4. 讨论

在本实验中，通过观察不同的菌种在蜂蜜培养基内的生长情况，测量菌落的直径以及观察菌丝的生长，从而得出菌种在蜂蜜培养基内不会继续生长，菌落直径无变化，并且菌落边缘的菌丝有死亡现象。蜂蜜不能为病原真菌提供生长所需要的营养物质，蜂蜜糖分高，渗透压高，会对菌落的生长产生抑制作用，不利于菌种的生长[7] [8] [9] [10]。

本实验通过研究病原真菌在蜂蜜的抑制作用下的存活时间，得出不同菌种在蜂蜜内的存活时间。病原真菌在蜂蜜中存活时间因种属差异而不同，烟草链格孢菌、水稻纹枯病立枯丝核菌、香蕉炭疽病芭蕉炭疽菌、百香果果腐病可可毛色二孢、白绢病齐整小核菌等 5 个菌在蜂蜜里的存活时间为 0~24 小时，此类病原真菌通过蜜蜂食物链传播的风险较低。白兰炭疽菌在蜂蜜里存活时间为 1~3 天，苦瓜枯萎病尖孢镰孢菌、香蕉枯萎病尖孢镰刀菌(古巴专化型)在蜂蜜里的存活时间是 3~7 天，石榴果白二轮蓝状菌在蜂蜜里培养 7 天后还能在 PDA 培养基内长出新菌落，可推测石榴果白二轮蓝状菌在蜜蜂的食物传递过程中可较长时间的在蜂蜜中存活，具有一定的真菌病害传播风险。病原菌对植物的侵染受到诸多因素影响[11]，在蜂蜜中较长时间存活的病原菌在蜜蜂采蜜中是否能造成病菌传播以及实际效力还需进一步研究。

通过观察不同病原真菌在蜜蜂体表的存活情况，根据所得菌落在花粉足培养基上的存活情况和菌圈大小分析，可发现试验病原真菌能够于蜜蜂体表存活至少 3 天且具有生长能力，当时间长达 7 天或更长时，病原菌即开始凋亡，失去生长能力。

5. 结论

当蜜蜂在采蜜过程中接触到某种植物病原菌，病原菌就可能在蜜蜂体表、花粉足中存活较长时间，蜜蜂在频繁的更换不同花朵、不同植物进行采蜜时，就可能存在将花粉足或体表中沾染的病原菌传播至新的花朵和植物中[12]，造成植物感染和病原真菌扩散。但是否会造成病菌实际性侵染以及这种通过采蜜时体表携带并造成传播的实际效力还需进一步研究。

参考文献

- [1] 丁桂玲. 蜜蜂的足[J]. 中国蜂业, 2012, 63(22): 56.
- [2] 张云毅, 武敏, 张旭凤, 郭媛. 蜜蜂授粉在设施农业中的应用和发展趋势[J]. 中国蜂业, 2022, 73(9): 30-32.
- [3] 李紫贤. 蜜蜂的行为(十) [J]. 蜜蜂杂志, 1994(11): 2.
- [4] 杨志波. 蜜蜂虫体微生物区系与植物病害相关性的研究[D]: [硕士学位论文]. 福州: 福建农林大学, 2010.
- [5] 屈婷婷, 黄智, 覃泽林, 卢庆南, 周保吉, 梁富华. 广西现代特色农业示范区建设现状分析[J]. 农村经济与科技, 2019, 30(4): 186-189.
- [6] Matzko, M.E., *et al.* (2020) 738. A Novel Molecular Diagnostic Assay for Identification of Fungal Pathogens. *Open Forum Infectious Diseases*, 7(Supplement 1), S418-S419. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa439.929>
- [7] Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., *et al.* (2005) Standardization of Antioxidant Properties of Honey by a Combination of Spectrophotometric/Fluorimetric Assays and Chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, **533**, 185-191. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.11.010>
- [8] Samboska, K. (2019) Powdered Honey—Dying Methods and Parameters, Types of Carriers and Dying Aids, Physico-chemical Properties and Storage Stability. *Trends in Food Science & Technology*, **88**, 133-142. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.019>
- [9] Alvarez-Suarez, J.M., Tulipani, S., Diaz, D., *et al.* (2010) Antioxidant and Antimicrobial Capacity of Several Monofloral Cuban Honey and Their Correlation with Color, Polyphenol Content and Other Chemical Compounds. *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 2490-2499. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.06.021>
- [10] Sun, L.-P., Shi, F.-F., Zhang, W.-W., *et al.* (2020) Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Honey Extract. *Foods*, **9**, Article 1039. <https://doi.org/10.3390/foods9081039>
- [11] 丁丽娜, 杨瑞英, 杨国兴. 植物与病原菌互作的蛋白质组学研究进展[J]. 微生物学通报, 2016, 43(2): 394-402.
- [12] 刘一博. 植物花朵挥发物对蜜蜂吸引效应研究[D]: [硕士学位论文]. 南昌: 江西农业大学, 2021. <https://doi.org/10.27177/d.cnki.gjxnu.2021.000281>