
姓名: 谢承翰

所属国别: 中国

所属省份: 上海市

所属学校: 华东师范大学第二附属中学

指导老师: 曲耀

课题名称: 声频技术对真菌生长发育和致病性的影响

----- 一种新型物理冷杀菌技术

声频技术对真菌生长发育和致病性的影响

————— 一种新型物理冷杀菌技术

By: 谢承翰

摘要

植物声频控制技术是近几年发展起来的新技术,能有效提高植物产量与抗病性。相较于会造成较大污染的化学农业来说,它具有广阔的发展前景。本课题从植物声频技术的另一个角度出发,以植物病原真菌——灰霉菌为实验对象,探究相同振幅、不同频率的声波对真菌生长发育和致病性的影响,结果发现:相较于真菌的生长发育情况,其致病性下降得更为明显,其中:800Hz的声频对灰霉菌影响最为显著,能使其孢子浓度下降94.5%;孢子致病能力明显减弱,在柑橘上的病斑直径下降了45.3%;抗渗透压调节能力减弱,抑制率高达76.05%。本课题证实了400Hz至2000Hz的声频能显著抑制灰霉菌的致病性。得出以上实验结论后,本课题还初步设计了利用声频技术进行杀菌的装置模型图,为农业生产和食品保鲜提供了现实参考。本课题的研究成果可与其他植物声频技术有机结合,从而筛选出既对植物有益,又能有效抑制病原真菌的最优声频,进一步为农业生产提供有益参考。

关键词 声频技术; 灰霉菌; 生长发育; 致病性;

目录

摘要.....	III
正文.....	1
1. 前言.....	1
1.1 课题由来.....	1
1.2 菌株选取.....	2
1.2.1 灰霉菌.....	2
1.2.2 青霉菌.....	2
1.3 研究背景——植物声频技术.....	3
1.4 本课题的研究意义.....	3
1.5 研究流程.....	3
2. 实验材料.....	4
2.1 实验材料.....	4
2.2 实验器材.....	5
3. 实验方法.....	5
3.1 灰霉菌、青霉菌的接种和培养.....	5
3.1.1 PDA 培养基的配置.....	5
3.1.2 真菌的接种与培养.....	5
3.2 定量施加声频的实验.....	5
3.2.1 施加声频影响培养皿中菌落的实验.....	5
3.2.2 施加声频影响孢子的实验.....	6
3.3 声频处理对真菌的影响的检测方法.....	7
3.3.1 显微镜观察真菌分生孢子形态变化.....	7
3.3.2 真菌孢子浓度变化检测.....	7
3.3.3 真菌孢子对番茄叶片的侵染能力检测.....	8
3.3.4 真菌孢子对柑橘和小金桔的侵染能力检测.....	8
3.3.5 真菌生长速率的测量实验.....	9
4. 实验结果.....	9
4.1 声频处理对灰霉菌生长发育和致病性的影响.....	9
4.1.1 特定声频处理对灰霉菌生长直径的影响.....	9
4.1.2 特定声频处理对灰霉菌孢子形态的影响.....	10
4.1.3 特定声频处理后灰霉菌孢子对番茄叶片致病能力比较.....	11
4.1.4 不同声频处理对灰霉菌孢子浓度的影响.....	13
4.1.5 不同声频处理对灰霉菌孢子致病性的影响.....	13
4.1.6 不同声频对高渗透压下真菌生长情况的影响.....	15
4.2 声频处理对青霉菌生长发育和致病性的影响.....	17
4.2.1 特定声频处理对青霉菌菌落形态的影响.....	17
4.2.2 特定声频处理对青霉菌孢子形态的影响.....	17
4.2.3 特定声频处理对青霉菌致病能力的影响.....	18
4.3 声频保鲜规模性应用的初步探究.....	19
5 讨论.....	19
5.1 不同声频处理灰霉菌效果不同的原因讨论.....	19
5.2 对受 2000Hz 声频影响的灰霉菌产生反常现象的解释.....	20

5.3 声频技术对植物与真菌的影响比较.....	21
6 结论与展望.....	22
7 收获与体会.....	23
参考文献.....	26
致谢.....	27
学术诚信声明.....	28

正文

1. 前言

1.1 课题由来

从小我就有个疑问：植物能听得懂音乐吗？如果能听懂，它们喜欢听什么呢？只不过碍于年龄和知识的限制，我一直没有得到答案，可问号却埋在了我的心中。长大后无意间我发现，原来植物真的能听懂声音，真的有科学家在研究并形成了植物声频技术！从那以后，我对植物声频技术产生了浓厚的兴趣，通过查阅资料，我了解到以下内容：

在应用研究方面，国内外已有多人研究并证明植物声频技术能显著提高农作物的产量并提高植物的抗病性。例如法国人切诺伊以声波处理的方式提高啤酒厂大麦的发芽率^[1]；中国学者侯天楨等人于 1994 年至 1998 年在美国对二十多种农作物进行声波处理和研究，发现农作物的产量显著上升^[2]。在抗病方面，蔬果生产中，声频处理可以明显减轻番箱的病虫害，与对照组相比，红蜘蛛、财虫、灰霉病、晚疫病、病毒病的发病分别下降了 6%、8%、10%、11%、11%。

在机理探究方面，绝大多数学者将研究重心放在了声波对植物细胞生长周期、生物酶、光合作用速率、基因的影响，如有人实验得出声波频率 400Hz 至 800Hz，强度在 90dB 到 110dB 内，随频率和强度的增加，以声波为代表的交变应力可以使有丝分裂 S 期细胞明显增加^[3]。而通过测定声频作用于药用植物铁皮石斛之后酶活性的变化，有学者也得出了适度的声频能使植物中 SOD、CAT、POD、APX 等生物酶活性提高的结论^[4]。然而，在众多报道中，对真菌受声频的影响却鲜有研究。

由此我想到：既然特定的声频可以显著提高植物的抗病性，这是不是因为声频处理后真菌的侵染能力降低了呢？目前，农业生产还在普遍使用化学杀菌的方法，防止灰霉病的常用的乙霉威 WP、施灰乐 SC(啞霉胺)、福美双 WP、扑海因 WP(异菌脲)、爱苗 EC、农利灵 WP 等等^[5]，防止早疫病的则有拿敌稳等。这些化学杀菌剂虽然能在短时间内有效的杀灭真菌，但会对环境造成一定的污染，

如拿敌稳对水生动物有剧毒。此外, 面对灰霉菌这种极易产生抗药性的真菌而言^[6], 化学杀菌剂通常会逐渐失去效果。此外, 化学杀菌剂虽然可以有效降低青霉菌的传播, 但长期使用后可能会引起人体中毒、病原菌不断增强的抗药性及污染周围环境等问题。而食物储存、保鲜方面, 低温等离子杀菌等高新技术虽然见效快、对食物破坏性小, 但能耗高、寿命短^[7]。使用二氧化氯对浓度有较高的要求, 且可能会对食物的风味产生影响^[8]。超声波杀菌则只能用于液体环境中^[9]。如果将植物声频技术直接作用于真菌, 在农业上可以提供优质土壤, 保护环境, 并且不用担心抗药性的威胁; 应用于食品行业时, 则可以用于大型仓库储存, 具有操作简便、不影响食物风味的优点。

在植物声频技术的机理探究方面, 如果能验证其对真菌的影响, 可以丰富这一技术的理论基础, 为探究机械波对生物的作用提供有益启示。因此, 我决定开展“声频技术对真菌生长发育和致病性的影响与应用探究”这一课题。

1.2 菌株选取

1.2.1 灰霉菌

灰霉菌 (*Botrytis cinerea*), 又叫做灰葡萄孢菌, 是世界上第二大广寄生性的病原真菌。环境潮湿时植物发病处表层产生大量的灰色霉层(分生孢子梗和分生孢子), 因此将该菌引起的植物疾病称为灰霉病。由于灰霉菌的孢子在空气中分布较广, 它不仅能够在农作物生长时侵染, 同样会给植物的采后阶段造成巨大损失。日常生活中遇到的果蔬由于灰霉菌的侵染就会长毛。就目前来讲, 还没有植物对灰霉菌产生抗性。而它自己则恰恰相反, 能在短时间内对多种化学试剂产生抗性。因此研究抑制灰霉菌的方法十分必要。

1.2.2 青霉菌

青霉菌, 属于子囊菌亚门, 不整囊菌纲, 散囊菌目, 散囊菌科, 青霉属。常见于潮湿的衣履、腐烂的水果、蔬菜、肉食上, 多呈灰绿色, 亦能引起柑橘的青霉病。青霉菌广泛存在于世界各个角落, 一般腐生在各种有机物上, 柑橘果实在受伤后易被青霉菌的分生孢子所侵入而发病。在贮运期间, 也可通过病健果触

碰而感染。由于腐烂后的果实会产生数量巨多的二氧化碳，溶于水汽后产生稀碳酸来腐蚀果皮，造成酸性环境，促进病菌加速侵染，更导致大量烂果，循环往复，高效难防。目前，化学杀菌剂虽然可以有效降低青霉菌的传播，但长期使用后可能会引起人体中毒、病原菌不断增强的抗药性及污染周围环境等问题。因此，如何高效、环保得防止青霉菌的侵害，是一个迫在眉睫的问题^[10]。

1.3 研究背景——植物声频技术

植物声频控制技术是一项新物理农业技术。它的基本原理是将特定频率的声波施于植物，使其与植物自身的发声频率相匹配，从而发生谐振，使植物产生一系列变化：如细胞分裂加速、更易吸收营养物质等等，最终达到增产、优质和抗病等目的。在我国，侯天侦教授在声屏蔽室的抗震台上利用多年研制出的 N 激光多普勒测振仪测定了植物自身的发声频率，并做出了相应的频谱分析，初步探索了植物自身发声频率与环境因子的变化规律^[11]。而在国外，也有实验证明适当的声频、甚至不同的音乐对植物生长均有促进作用。

1.4 本课题的研究意义

植物声频技术是物理农业的重要方面，因其利于生态保护、可循环使用、增产效果好的特点，很可能会成为今后农业发展的重点。在目前的技术条件下，研究特定声频对真菌的影响，有一定的理论意义和现实意义。

本课题研究特定频率的声频对真菌生长发育和致病性的影响。通过研究能筛选出有效抑制植物病原真菌的声频，并可以将此研究结果与植物所适宜的声频结合起来，不仅可以为声频技术提供理论基础，也能为农业提供无菌土壤，防治植物灰霉病，农作物培育以及食品储存、保鲜提供新方法，找出新思路。从长远来讲，本课题对所有由真菌引起的植物病、动物病的防治都有一定的指导意义。

1.5 研究流程

主要研究流程如图 1 所示。具体处理过程包括灰霉菌、青霉菌的培养、番茄幼苗的培育、为真菌施加特定频率音频、孢子、形态观察、以番茄、柑橘为接

种对象的致病能力的检测等等。

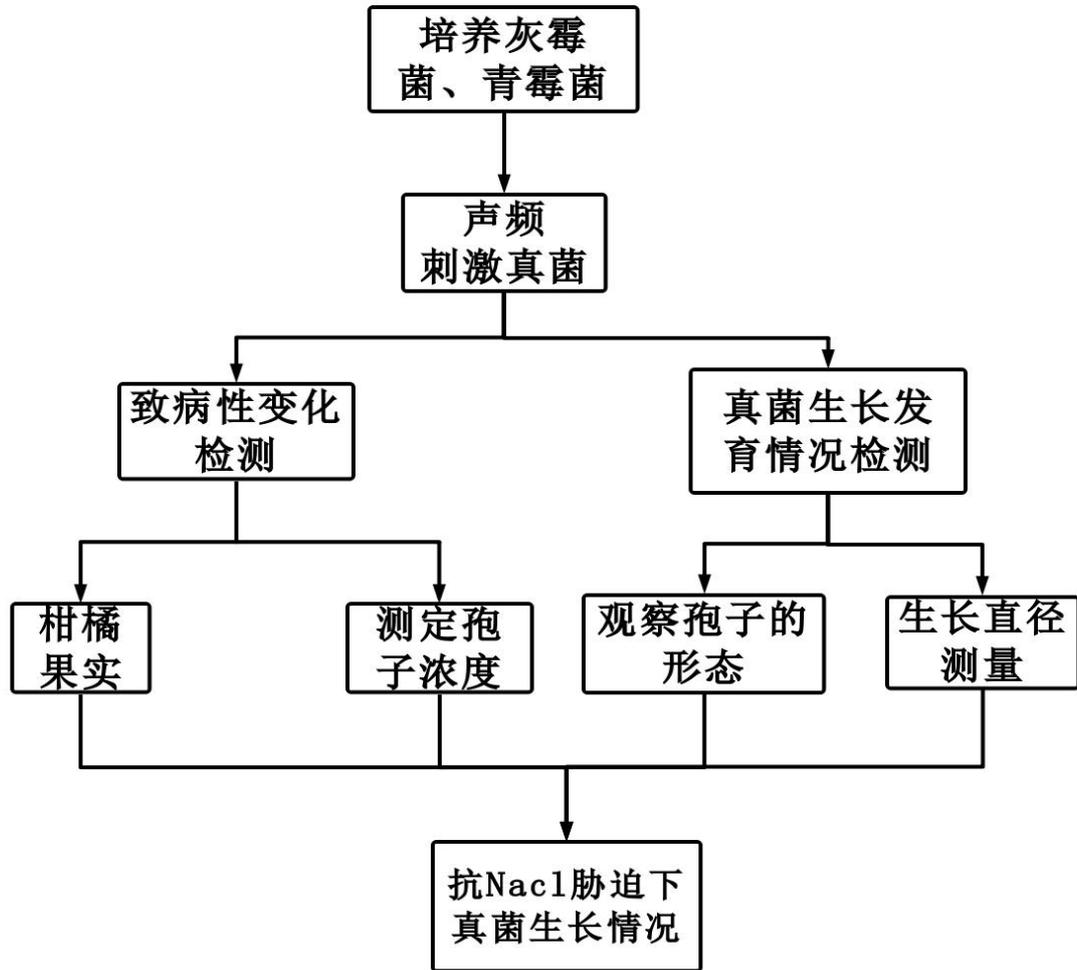


图 1 科学性研究流程

2. 实验材料

2.1 实验材料

灰霉菌（灰葡萄孢属，华东师范大学提供）；青霉菌（华东师范大学第二附属中学创新实验室提供）；蕃茄苗（从沭阳县醉花轩园艺场和孙桥现代化农业园区购得）；黑土和蛭石（从长白山营养土黑土腐殖土公司购得）、茂谷柑（从上海市永辉水果市场购得）、砂糖桔（从上海市永辉水果市场购得）

2.2 实验器材

移液器（川布兰公司）、超净工作台、显微镜（olympus）、离心管、人工气候箱（宁波江南仪器厂）、高速冷冻离心机（Eppendorf）、微波炉（Galanz）、高压蒸汽灭菌锅（日本三洋, MSL-3750）、电热鼓风干燥箱（Keelrein, DHG-9245A）、JEM-2100 透射电子显微镜

3. 实验方法

3.1 灰霉菌、青霉菌的接种和培养

3.1.1 PDA 培养基的配置

称取 12.900g 马铃薯葡萄糖琼脂及 300 毫升蒸馏水，倒入锥形瓶中。在瓶口盖上封瓶膜，用报纸密封锥形瓶口，并用细线扎紧。将锥形瓶放入高压蒸汽灭菌锅中，在 101Kpa，121°C 下进行灭菌 20 分钟。灭菌完毕后取出培养基，并放入电热鼓风干燥箱中烘干瓶盖。随后在超净工作台（需提前 20 分钟紫外杀菌）中将培养基倒入培养皿，晾干备用。

注：如果需配置含 0.5 摩尔每升 NaCl 的培养基，则在称取马铃薯葡萄糖琼脂和蒸馏水的同时加入 8.775g 的 NaCl，其余步骤不变。

3.1.2 真菌的接种与培养

超净工作台提前灭菌，打开酒精灯，在酒精灯旁用接种针在灰霉菌和青霉菌菌种上划一个约 3mm³ 的菌块，将有菌丝一面朝下，移入 PDA 平板中央。将培养皿放在 25°C 环境中培养。

3.2 定量施加声频的实验

3.2.1 检测声频对培养皿种菌落的影响

表 1 施加声频的组别与分类 (1)

菌种	组别	施加声频	编号
灰霉菌	对照组 (CK)	无	CK-B
	处理组	400Hz	B1
		800Hz	B2
		1500Hz	B3
		2000Hz	B4
青霉菌	对照组 (CK)	无	CK-P
	处理组	800Hz	P1

前人研究显示, 植物种类不同, 对其有益的声频频率波段也不同, 大多数植物所适合的频率在 800 Hz 至 2000Hz 之间。因此, 我选用了如上表所示的声频分别对灰霉菌和青霉菌进行处理, 其中灰霉菌共 5 组, 其中 1 组为对照组, 另外 4 组每天持续施加响度恒定为 100 分贝、频率分别为 400Hz、800Hz、1500Hz、2000Hz 的音频 (通过电脑软件制造、MP3 player 录制而得) 16 小时。青霉菌共 2 组, 声频频率为 800Hz, 响度为 100 分贝, 其余处理方式与灰霉菌相同。考虑到培养皿的血盖可能会阻碍声波的传递, 故在释放声频时将所有培养皿的血盖打开。控制实验环境温度恒定为 25°C, 实验环境事先用 75%酒精消毒。

表 2 施加声频的组别与分类 (2)

菌种	组别	施加声频	编号
灰霉菌	对照组 (CK)	无	CK-B
	处理组	800Hz	B1
		1500Hz	B2
		2000Hz	B3
	对照组+Nacl	无	CK-N
	处理组+Nacl	800Hz	N1
		1500HZ	N2
		2000HZ	N3

3.2.2 检测声频对孢子的影响

收集真菌孢子, 将其接到培养皿中生长 72h 后, 采用 3.3.2 所述方法获得孢子, 控制浓度相同后分装在 4 根 2ml 的离心管中。放置在响度为 100dB 频率分别为 800HZ、1500HZ、2000HZ, 温度均为 18°C 的环境下处理 7 天。对照组置于相同条件下的安静环境中。

实验 7 天后, 将 CK-B, B1,B2,B3 的孢悬液接种于只含 PDA 的培养基中, 将 CK-N,N1,N2,N3 的孢悬液接种于含有 Nacl 及 PDA 的培养基中, 观察真菌在不同渗透压中的孢子萌发和菌丝的生长直径变化。^[12]

3.3 声频处理对真菌的影响的检测方法

3.3.1 显微镜观察真菌分生孢子形态变化

(a) 光学显微镜：用剪刀剪取一小段透明胶，用小镊子夹住一个角，轻轻的粘取一些菌丝或者孢子，然后将其放入滴有一滴清水的干净载玻片上，置于olympus 显微镜上对对照组和实验组的分生孢子形态进行观察并拍照记录^[13]。

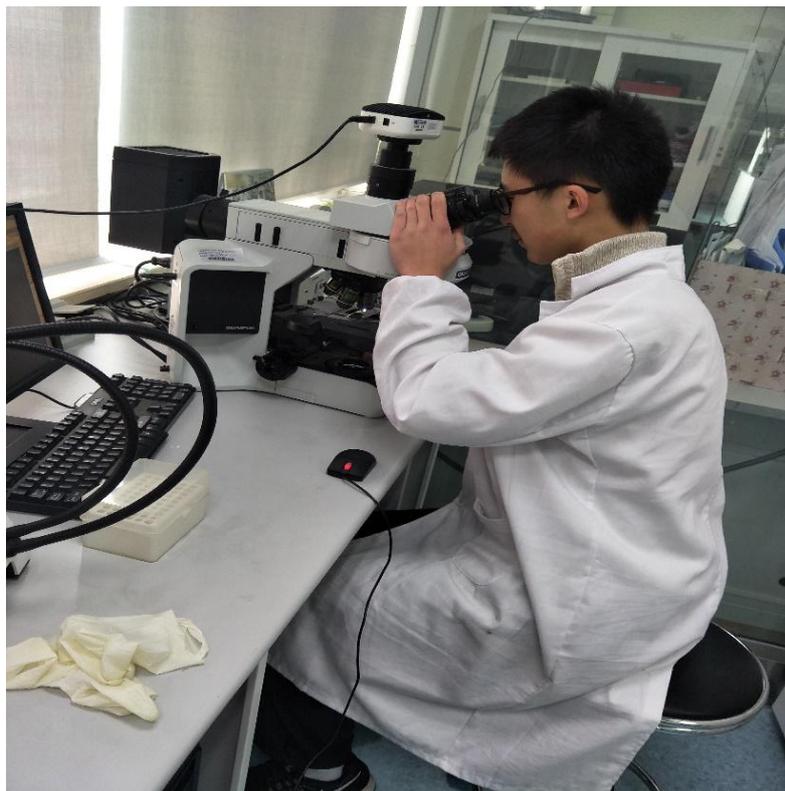


图 2 显微镜观察分生孢子形态

(b)：透射电子显微镜：将加入少许表面活性剂的纯净水倒入培养皿中，用移液器枪头轻轻拨动菌丝使孢子脱落。将含有孢子的液体倒入漏斗中，用三层纱布将菌丝过滤去除，获得孢子悬浮液，分装入 2ml 离心管中。

用高速冷冻离心机离心，4500rpm，离心 10min。去除上清液，将所有孢子集中在一个离心管中。加入戊二醛固定过夜，送至华东师范大学制作电镜样品。

3.3.2 真菌孢子浓度变化检测

将加入少许表面活性剂的纯净水倒入培养皿中，用移液器枪头轻轻拨动菌丝

使孢子脱落。将含有孢子的液体倒入漏斗中，用三层纱布将菌丝过滤去除，获得孢子悬浮液，分装入 2ml 离心管中。

用高速冷冻离心机离心，4500rpm，离心 10min。去除上清液，将所有孢子集中在一个离心管中，控制溶液体积均为 0.5ml。用血球计数法在 olympus 显微镜下测得相同格子内孢子的数量。取平均值后与其他组别相互比较。

3.3.3 真菌孢子对番茄叶片的侵染能力检测

取上一实验所获得的孢子悬浮液，加入纯净水，用血球记数板将孢子悬浮液浓度调整为 (0.2×10^7 个/ml)，用移液枪吸取 10 微升滴加在番茄幼苗叶片上（避开主叶脉），置于 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 条件下恒温培养，3 天后观察对照组和实验组番茄叶片的发病情况。

3.3.4 真菌孢子对柑橘和小金桔的侵染能力检测

用直径 1 mm 的孔径针刺伤柑橘，大柑橘 4 处刺伤（深度约为 5 mm），每处刺伤间隔约 20 mm。分别滴加 10 微升不同组的孢子悬浮液 (0.2×10^7 个/ml)，接种方式如下图所示，其中一处刺伤滴加对照组的孢子悬浮液，一处滴加清水对照，另外两处刺伤分别滴加声频处理组的孢子。



图 3 接种实验示意图

小金桔五个为一组，共三组，用相同的方法进行刺伤，每组分别滴加不同组

的孢子悬浮液 10 微升 (0.2×10^7 个/ml) 如上图 3 所示。72h 后, 用游标卡尺测定病斑直径。

3.3.5 真菌生长速率的测量实验

实验开始前, 在培养皿底面做两条互相垂直的直线, 与真菌菌落的生长边界会有 4 个交点。在开始实验后 72h 后均在菌落与直线的交点处划线标记, 可得到四个点, 以此用游标卡尺进行测量, 得到真菌的生长直径。按下式计算菌丝生长抑制率: 抑菌率 (%) = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) \div 对照菌落直径 \times 100%

4. 实验结果

4.1 声频处理对灰霉菌生长发育和致病性的影响

为了找到既有益于植物生长, 又能抑制真菌的最优声频, 首先选取了对植物有益的特定声频——800Hz、100dB 施加于灰霉菌, 随后对灰霉菌的生长发育和致病性进行检测。

4.1.1 特定声频处理对灰霉菌生长直径的影响

检测真菌菌落生长直径的变化是判断真菌生长发育情况的重要指标之一^[14]。为了判断声频处理对灰霉菌生长情况的影响, 在实验开始 3d 后均测量了真菌的生长直径, 具体情况如图 4 所示。

灰霉菌生长直径变化

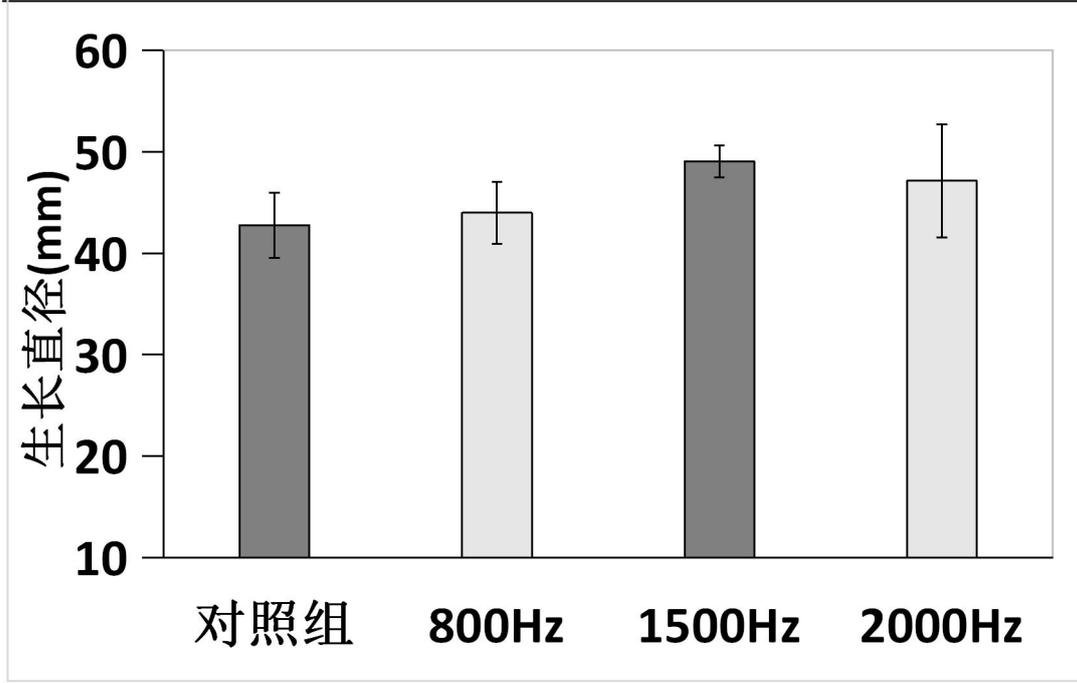


图 4 特定声频处理后灰霉菌生长直径变化

从图中可以看出，受过 800Hz 声频长期影响的处理组的生长直径明显都要劣于对照组。最终得到平均的抑制生长比高达 75.07%，说明声频处理能有效抑制灰霉菌的菌落生长。

4.1.2 特定声频处理对灰霉菌孢子形态的影响

为了进一步观察声频是否对灰霉菌的孢子形态造成影响，先用 olympus 显微镜检测了处理组和对照组的分生孢子形态。由于在光学显微镜下无法得出孢子形态的差异，本课题又进一步使用透射电子显微镜进行了观察。由图 5 可知：经声频处理后灰霉菌分生孢子与对照组相比无明显变化，说明声频处理可能并没有改变灰霉菌的分生孢子形态，分析原因，可能是由于声频处理时间较短所致，也有可能声频只会改变灰霉菌孢子的穿透能力，不会对灰霉菌的孢子形态产生影响。

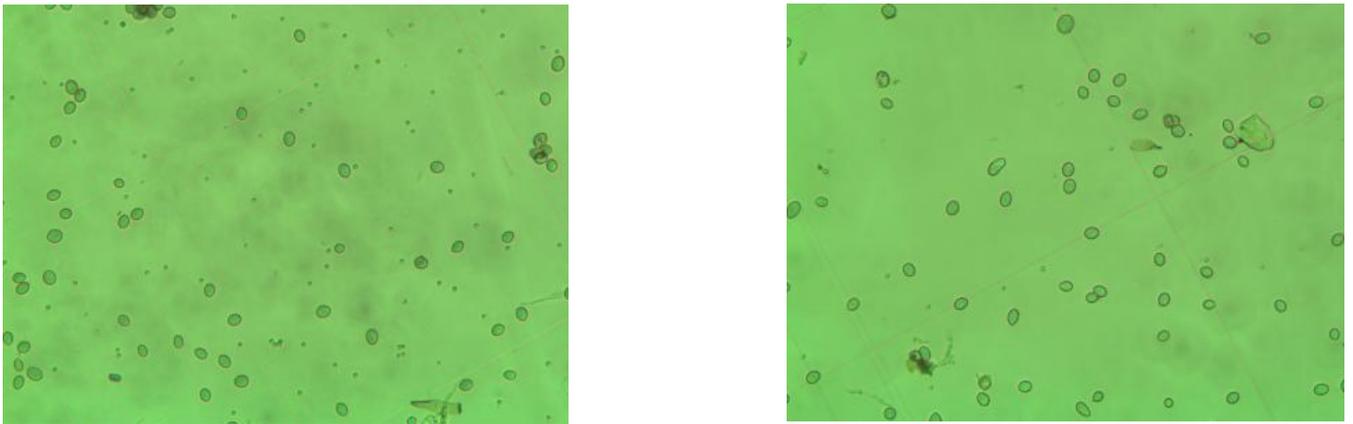
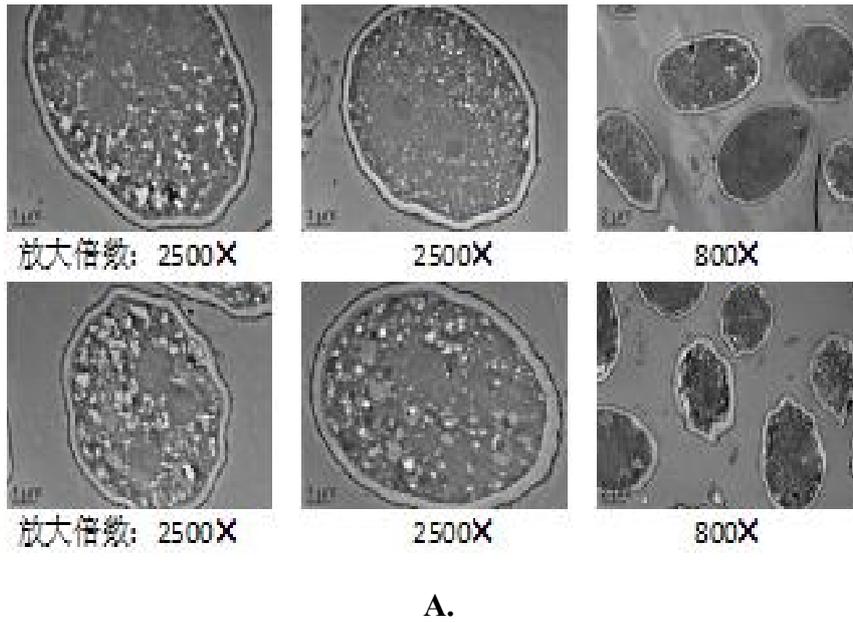


图 5 特定声频对孢子形态的影响

(A.透射电镜下即使观测图; B.光学显微镜下图(左处理, 右对照), 放大倍数: 100 倍)

4.1.3 特定声频处理后灰霉菌孢子对番茄叶片致病能力比较

检测致病能力是研究病原菌抑制方法的必要指标, 为了检测声频处理对真菌致病能力的影响, 将一定浓度的孢子悬浮液 (0.2×10^7 个/ml) 滴在番茄叶片上, 一段时间后观察发病情况。结果如图 6A、B、C 所示: 图中叶片(或对叶)的左侧滴加的是处理组的孢子悬浮液, 右侧为对照组。从图中可以明显看出, 经过声

频处理后, 灰霉菌孢子的致病能力较对照组明显降低, 具体体现在病斑减小和颜色变淡两个方面。实验共收集数据 15 组, 图中所示是三组较有代表性的样品。

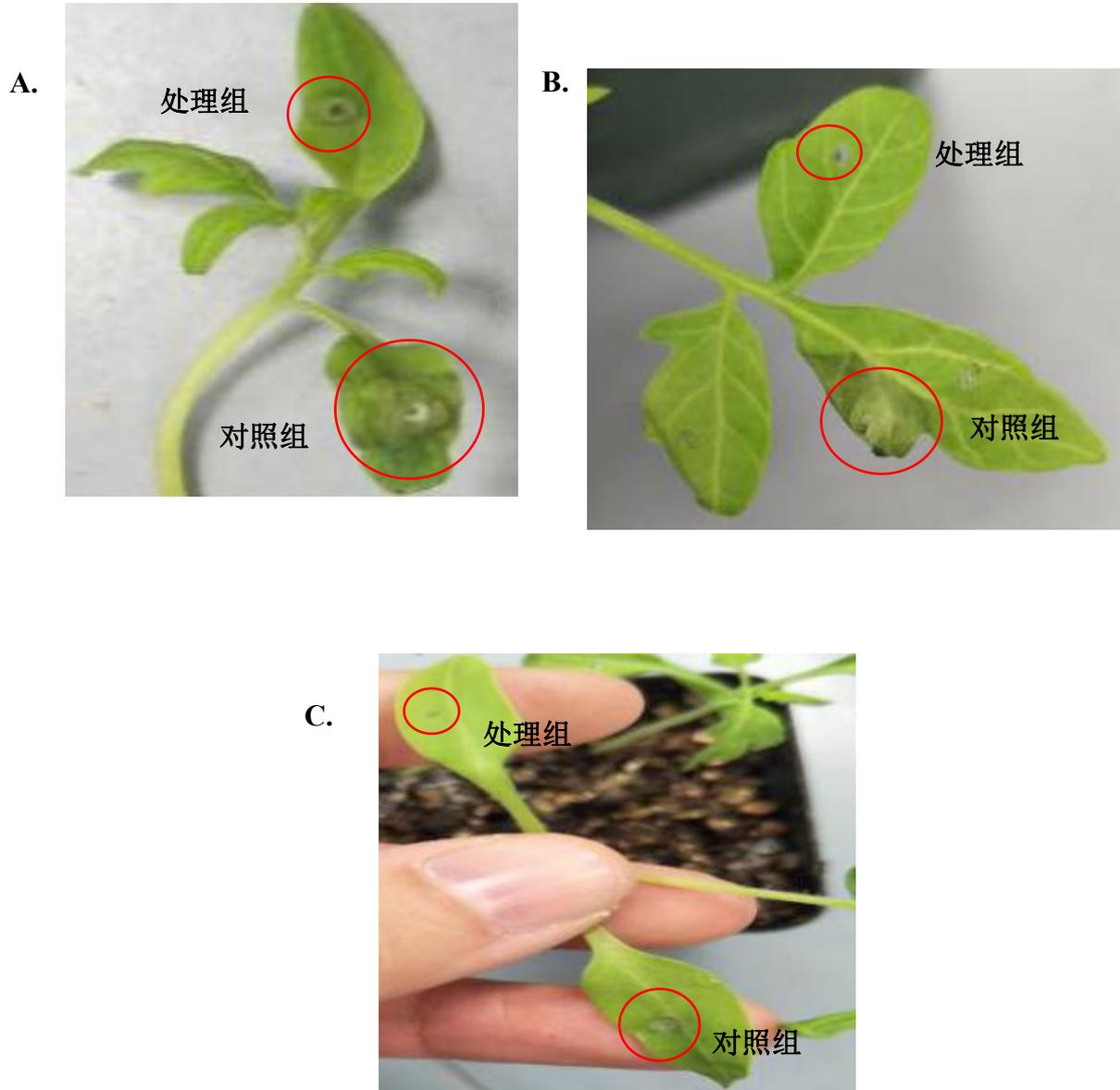


图 6 特定声频对灰霉菌孢子侵染番茄叶的影响

(A、B、C 图均为左侧叶片滴加处理组孢子悬浮液, 右侧叶片滴加对照组孢子悬浮液, $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 环境中放置 3 天, 实验共收集数据 15 组, 以上是三组较有代表性的样品)

由于 $800\text{Hz}\sim 2200\text{Hz}$ 是对大部分植物较为有益的声频, 我们猜测对于真菌来说可能不同的声频也会有不同的效果, 因此又用四组不同的声频 (400Hz 、 800Hz 、 1500Hz 、 2000Hz) 施加于灰霉菌, 并对灰霉菌的孢子浓度和致病性进行了检测, 结果如下:

4.1.4 不同声频处理对灰霉菌孢子浓度的影响

将声频处理后不同组别的孢子悬浮液定为相同体积, 取 10 微升滴于血球计数板上, 放在显微镜下进行计数。统计结果如图 7 所示: 对照组的浓度为 3.94×10^6 个/ml, 400Hz 处理组浓度为 1.24×10^6 个/ml, 800Hz 处理组浓度为 0.22×10^6 个/ml, 1500Hz 处理组浓度为 0.59×10^6 个/ml, 2000Hz 处理组浓度为 0.30×10^6 个/ml, 孢子减少比率分别为 68.5%, 94.5%, 85.2%, 92.3%, 以上数据说明不同声频处理对灰霉菌孢子产量均有较强的抑制作用, 其中 800Hz 的抑制效果最好。

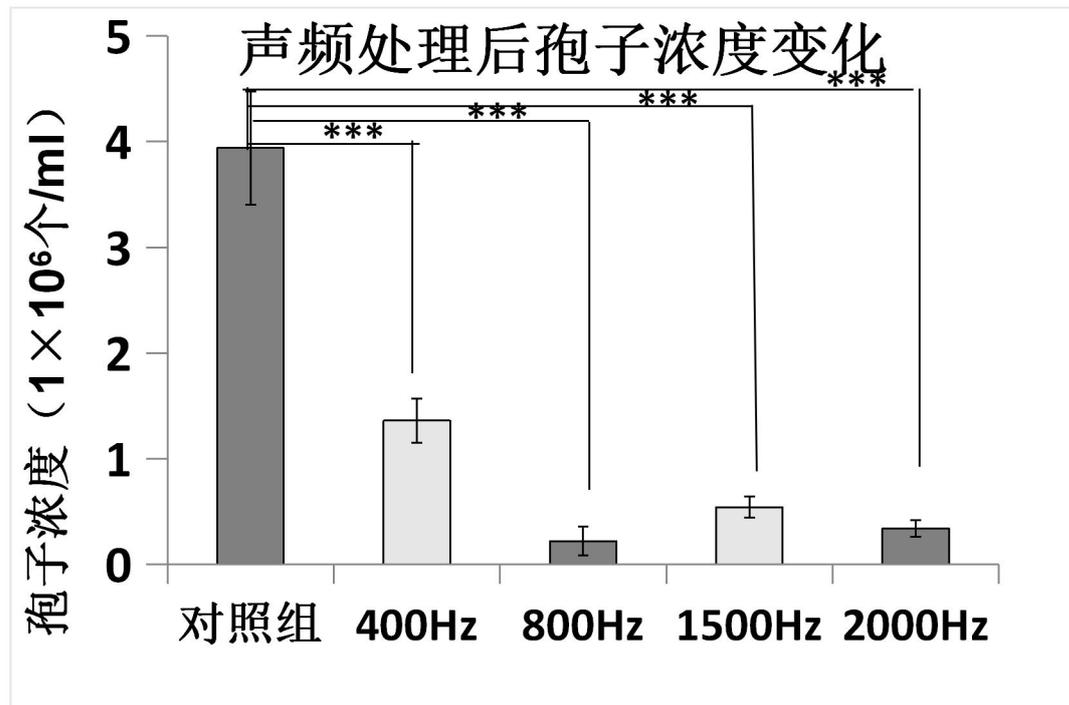
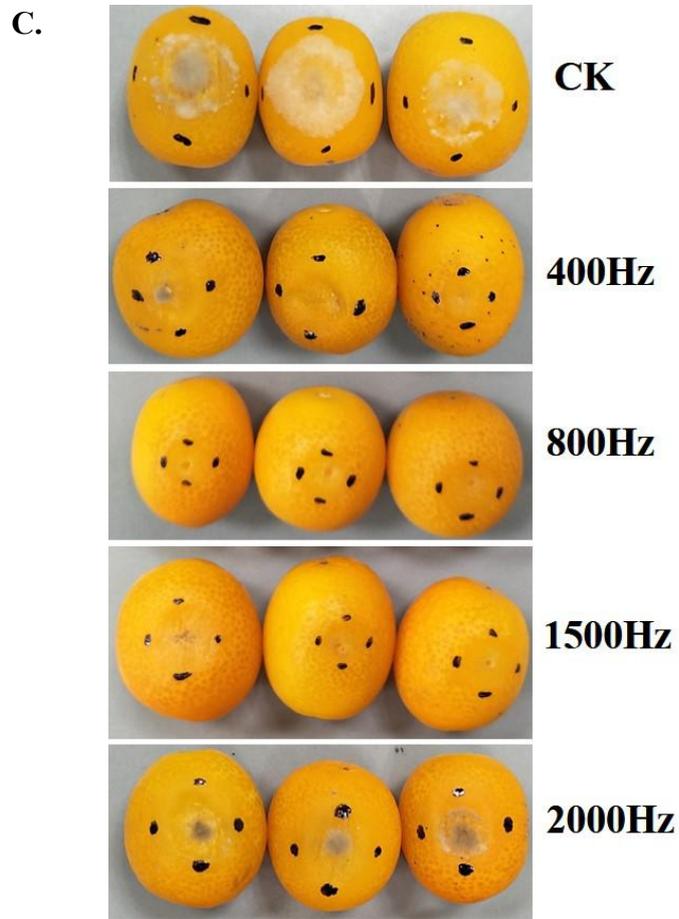
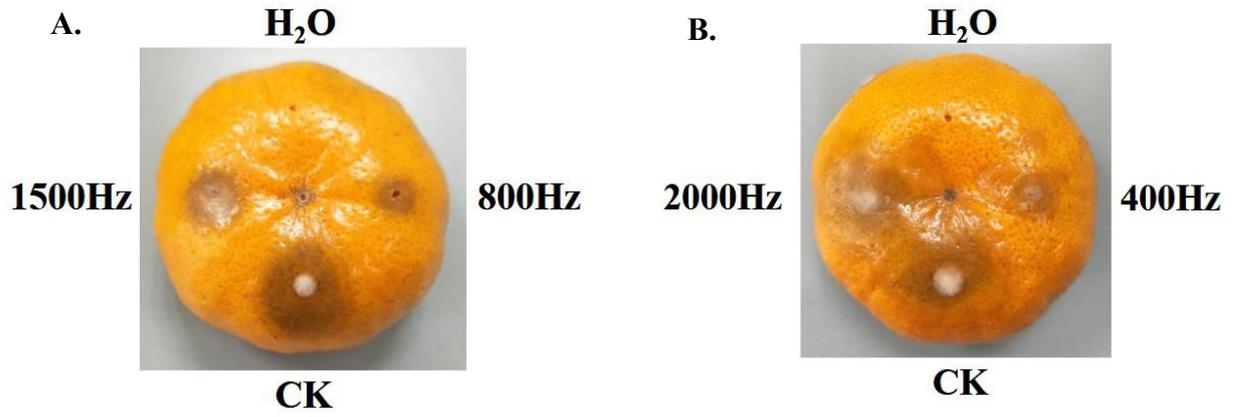


图 7 不同声频处理对灰霉菌孢子浓度的影响

4.1.5 不同声频处理对灰霉菌孢子致病性的影响

收集不同声频 (400Hz、800Hz、1500Hz、2000Hz) 处理后灰霉菌的孢子将其浓度调为 0.2×10^7 个/ml, 利用刺伤法对柑橘和小金桔进行接种, 结果如图 8 所示, 图 A、B 为柑橘作为接种对象的致病性结果; 图 C 为小金桔作为接种对象

的致病性结果；图 D 为小金桔病斑直径统计结果，为了方便观察，将病斑的软腐部分用黑色记号笔进行了标记。



D.

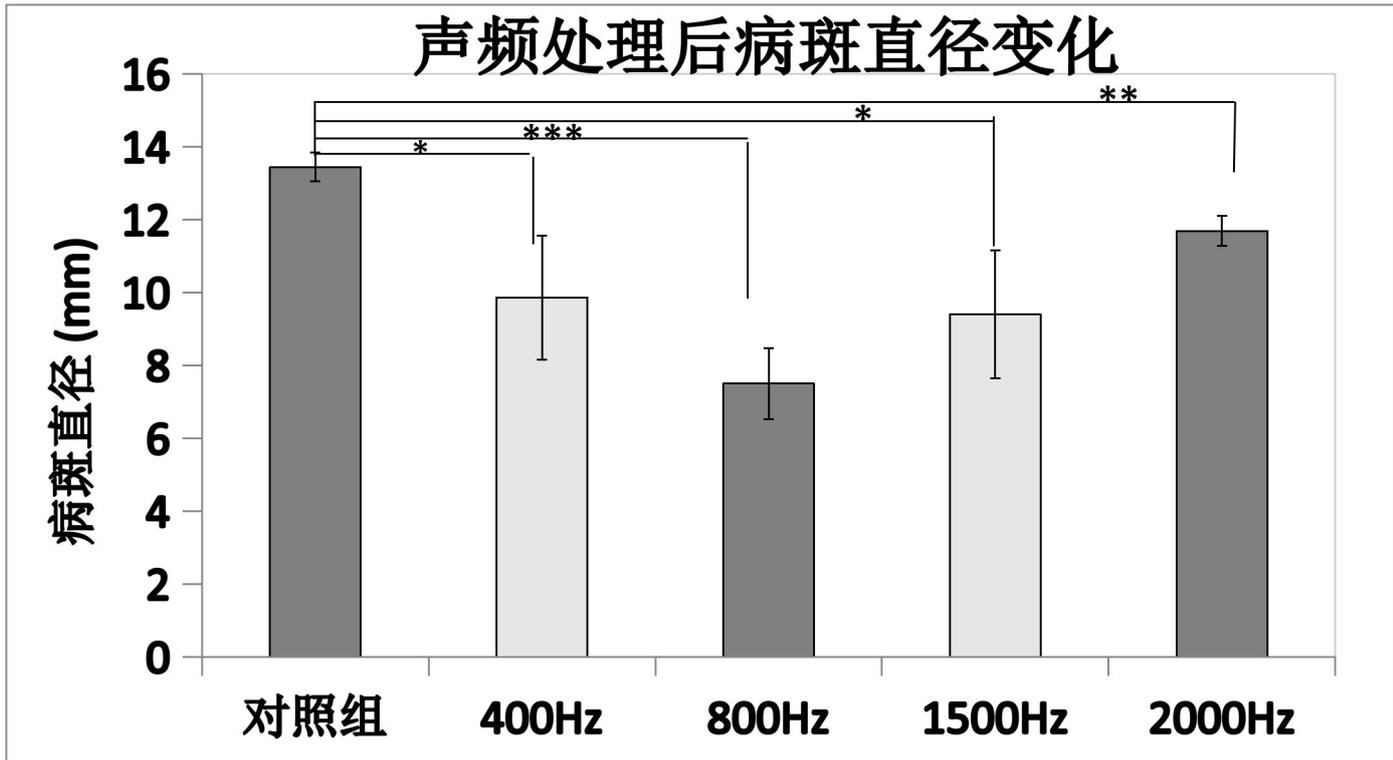


图 8 不同声频处理对灰霉菌孢子致病性的影响

(实验共收集数据 60 组, 上述图片均选取有代表性的样品。)

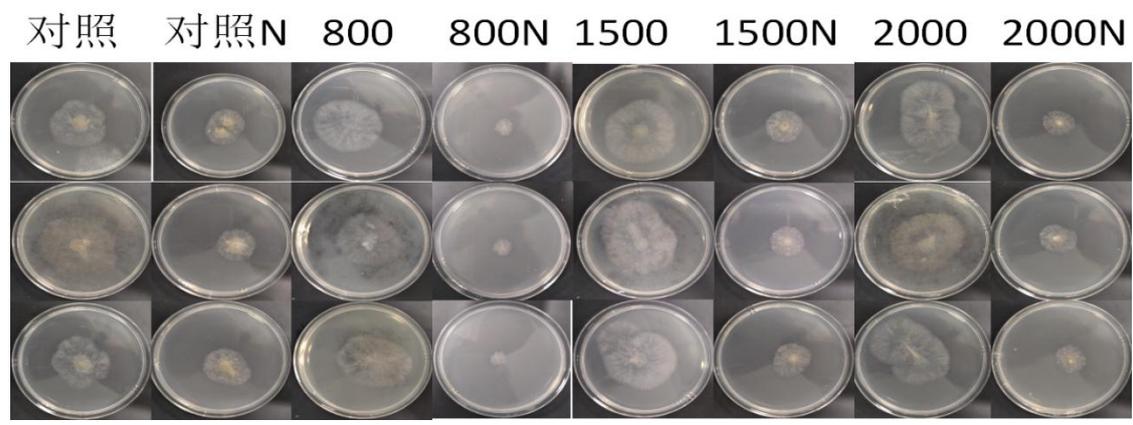
通过比较可以发现, 无论是对大柑橘还是小金桔, 4 种不同频率的声频都对真菌的致病能力产生了一定的抑制作用, 这同样体现在病斑大小和发病程度上。其中, 800Hz 和 1500Hz 的声频的抑制作用较为明显, 病斑面积分别缩小了 45.3% 和 31%, 而频率较低的 400Hz 和较高的 2000Hz 效果都略逊一筹。这表明: 尽管特定声频对真菌生长都有一定的抑制作用, 但对于同一种真菌, 只有频率在一定范围内的声频才能有最佳的效果。

我们猜测, 真菌相同时间内长出的孢子浓度越低, 致病性就应该越弱, 这两点也在受 800Hz 的真菌上体现了高度的一致性——它不仅孢子最少, 致病性也最弱。然而, 2000Hz 的真菌却表现反常——它的孢子浓度虽然是仅次于 800Hz 的, 但病斑面积却仅次于对照组。这种反常现象可能的原因, 将会在 5.2 详细论述。

4.1.6 不同声频对高渗透压下真菌生长情况的影响

为了从另一个角度探究真菌声频影响下致病性下降的原因, 本课题计划探究灰霉菌渗透压调节能力的变化情况。将 20 微升的孢悬液 (1×10^6 个每升) 滴入 0.5M NaCl 和无 NaCl 的培养基中。结果如图 9: 在 0.5M NaCl 渗透条件下, 菌落相较于无 NaCl 时都有一定程度的下降, 但经声频影响后灰霉菌渗透压调节能力变弱, 尤其是 800HZ 影响下, 菌丝生长抑制率达到 76.5%, 1500HZ 则是 47.2%, 2000HZ 是 56.3%这与对照组的 32.5%都构成了较大差异。而这种差异, 也是和病斑直径的数据与结论相吻合的。

A.



B.

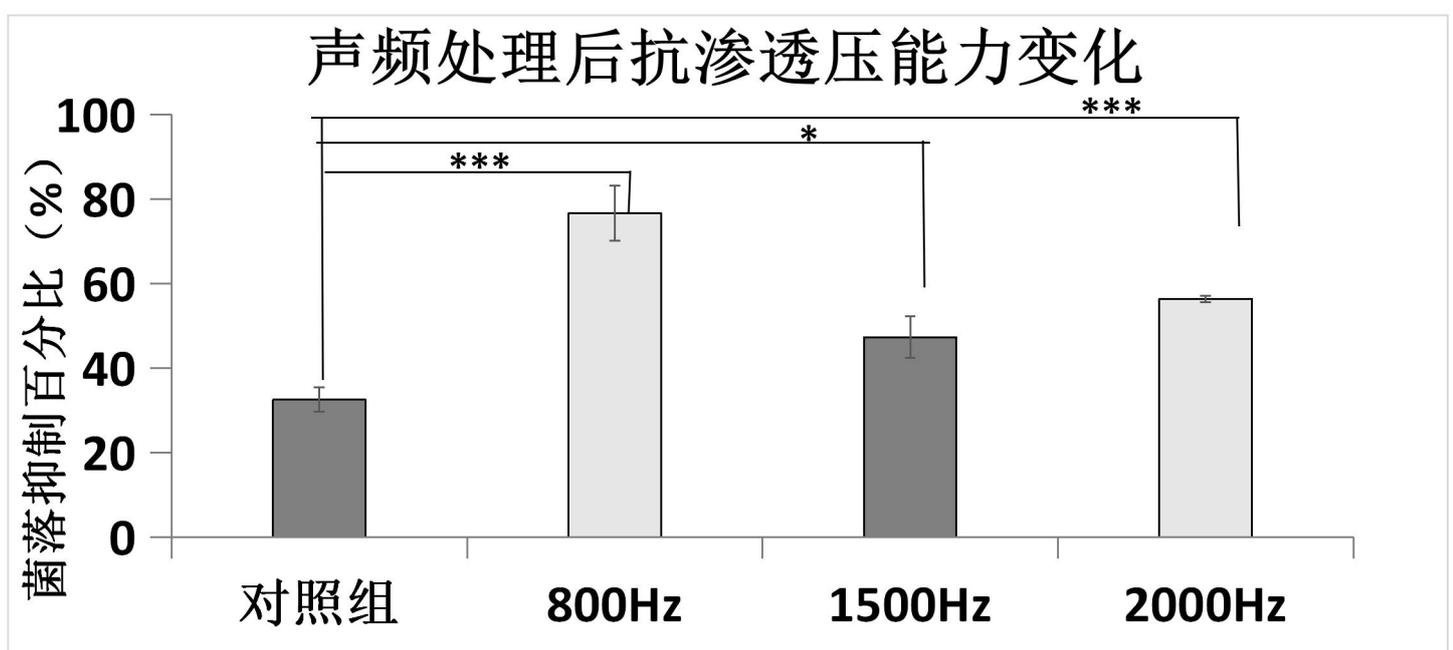


图 9 声频处理后抗渗透压能力变化

4.2 声频处理对青霉菌生长发育和致病性的影响

4.2.1 特定声频处理对青霉菌菌落形态的影响

除了灰霉菌以外, 青霉菌也是一种常见的植物病原真菌, 能够侵染很多植物并引起疾病, 造成严重减产, 因此本课题也探究了声频技术对青霉菌的影响。

选用 800Hz、100dB 声频施加于青霉菌, 一段时间后观察菌落形态, 结果如图 10 所示, 其中 A、B 为处理组, C、D 为对照组。可以看出, 经特定声频处理 2d、共 32h 的青霉菌形态发生明显变化, 局部向上翻卷, 疑似脱水。这表明声频处理同样能够影响青霉菌的生长。猜测其原因, 可能是因为声频给予的交变应力场促使真菌细胞分裂加速, 使之消耗水分的速率也加快, 最终导致其脱水变形^[3]。

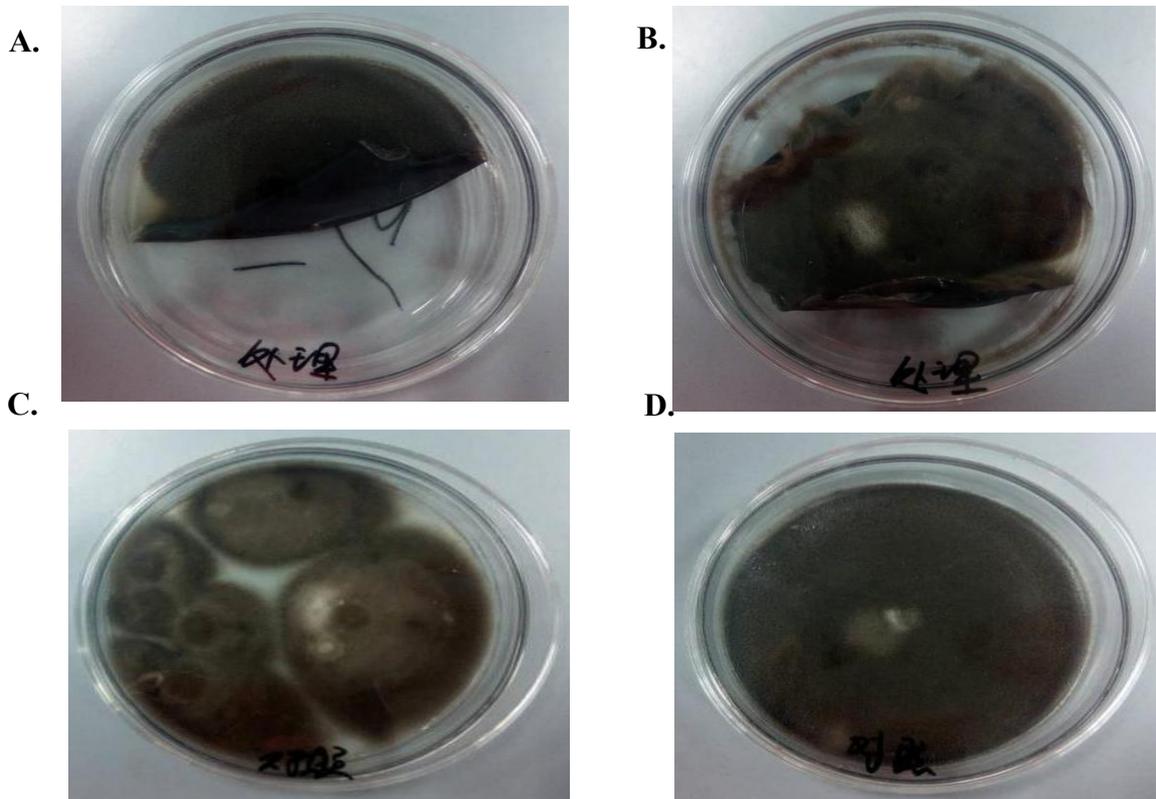


图 10 声频处理对青霉菌菌落形态的影响

(处理时间为三天, A、B 为处理组, C、D 为对照组)

4.2.2 特定声频处理对青霉菌孢子形态的影响

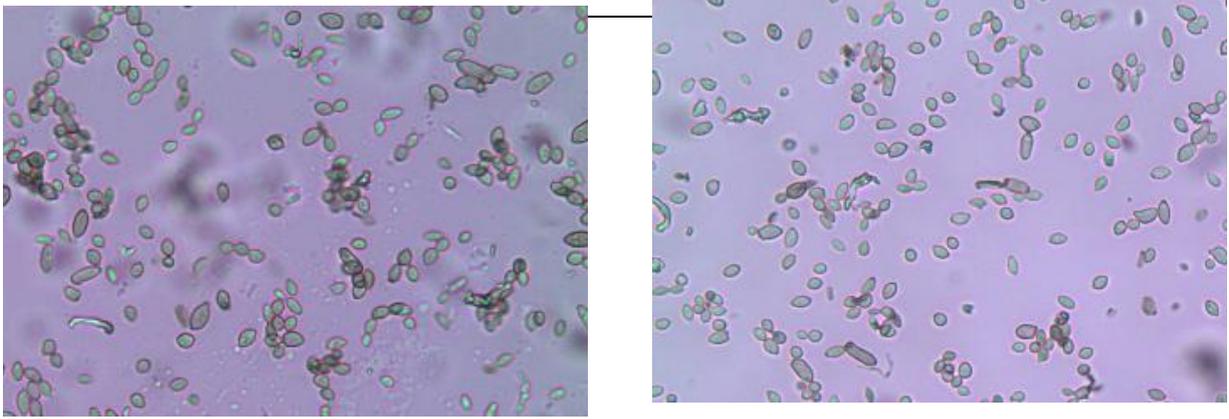


图 11 声频处理后青霉菌孢子形态

由于菌种本身的原因青霉菌的孢子要远远多于灰霉菌，但从上图 11 可以看出，32h 的声频处理后，在光学显微镜下依旧观察不出真菌孢子的结构和大小产生大的变化。

4.2.3 特定声频处理对青霉菌致病能力的影响

将对照组和处理组的青霉菌孢子浓度调整为 0.2×10^7 个/ml，利用刺伤法对柑橘进行接种，放置在 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 环境中培养 3 天，通过柑橘病斑的大小和病变快慢来判断青霉菌的致病性。具体结果如下图所示。



A. 对照组

B. 处理组

图 12 声频处理后青霉菌对柑橘的致病能力比较

从图 12 可以看出, 仅仅三天后, 对照组已经发生了较为明显的病变, 病斑面积大、颜色深, 而处理组还无明显变化。这表明声频技术对青霉菌的致病能力也有较好的抑制作用。

4.3 声频保鲜规模性应用的初步探究



图 13 声频保鲜装置初步模型

通过上述对青霉菌和灰霉菌的检测, 可以得出结论: 声频处理确实能够对真菌的生长发育和致病能力产生显著影响, 因此可研制一种声频处理实物模型图, 应用于农产品运输和食品保鲜上。

初步设计的装置为: 将声频发生器安置在像冷藏柜一样的柜子中, 该播放器具备可调节频率、响度的功能, 以适用于不同食物的储存。当会导致食物变质的真菌种类不同时, 环境中的温度和湿度改变时, 都可以选取不同的声频。再在柜壁中添加一层如铁、钢等密度较大的材料, 以阻绝声波对外部世界的干扰。

现在超市内所用的冷藏柜功率在 700 至 8000W 左右, 而安装在汽车内的那种电喇叭功率也不过在 60 至 90W, 因此, 如果使用该装置进行食品保鲜, 能够大幅度减少能耗。故该产品有一定的经济应用价值。

5 讨论

5.1 不同声频处理灰霉菌效果不同的原因讨论

本课题的研究结果表明, 800Hz 的声频对灰霉菌的抑制效果最好, 1500Hz 次之, 而过低的频率 (如 400Hz) 或过高的频率 (如 2000Hz) 抑制效果均不佳。

那么, 为什么不同声频的处理效果会有所不同呢? 借助于前人对植物的研究, 我认为可能的原因有 4 点:

第一: 特定声频的施加作为一种逆境, 使致病相关基因, 尤其是与抗渗透压调节能力有关基因的的表达与修饰产生变化, 如甲基化、乙酰化等等。因此, 真菌产生了与环境有关的新适应酶或其他产物, 使其致病性降低。考虑到现在的研究成果, 这种可能性是最高的。

第二: 声波是一种机械波, 是交变应力的一种载体。而此前已有成果表明, 一种复杂关系存在于外界应力与细胞生长之间。在细胞内, 应力信号的压迫使细胞分裂的取向平行于主应力成正相关。因此声波可能对真菌的细胞分裂的周期和过程产生了直接的影响, 从而体现在致病性、菌落直径的宏观指标上。2000Hz 孢子浓度少、致病性强的反常现象可能就是这种理论的一个依据。

第三: 声频的刺激可能会降低一些真菌生理过程中所需酶的活性, 从而抑制真菌的代谢过程。

第四: 特定声频改变了细胞壁的热力学相行为, 改变细胞膜蛋白质二级结构和细胞膜的流动性, 阻碍了真菌内部物质的运输。

5.2 对受 2000Hz 声频影响的灰霉菌产生反常现象的解释

由 4.1.5 和 4.1.6 的结果我们知道, 经受 2000Hz 声频处理的灰霉菌尽管孢子量较少 (仅略多于 800Hz), 但它的致病性却是仅次于对照组的。这样的反常现象值得我们进一步思考、探究。

据前人研究, 经特定声频影响后, 植物在同一时间内 G_0 、 G_1 期细胞会减少, S 期细胞增多, 因此声频能够通过促进细胞分裂而促进细胞的生长^[3]。这也可能是 2000Hz 声频处理后灰霉菌孢子减少, 致病性却增强的原因, 即: 2000Hz 的声频频率较高, 它更容易加速真菌的细胞分裂, 使原真菌将汲取的大部分营养用于菌丝的营养生长, 而孢子的产生是一种生殖生长, 由于营养分配不均衡, 最终导致孢子数量减少。但是这些少量的孢子能够继承真菌强大的分裂能力, 当接种后, 孢子进入水果内部时, 2000Hz 组孢子强大的分裂能力最终导致其致病性增强。

但是, 由于现在没有确切的数据, 这一理论还未被证实。为了验证此猜想, 我将在后续的实验中对声频处理后灰霉菌菌丝的生物量进行定量测定, 即在声频

处理后将菌丝进行收集，测定其鲜重和干重，与对照组进行比较，以此验证 2000Hz 声频处理后灰霉菌是否将更多的能量用于菌丝的生长分裂，而不是孢子的产生。

5.3 声频技术对植物与真菌的影响比较

植物声频技术是一项新兴的物理农业技术，近几年来，众多学者以植物为实验目标，对这一技术的机理和应用展开研究，取得了一定的成果。综合这些研究结果可以发现：不同的植物所适应的声频是不同的^[16]。如：图 14 是前人探究不同特定声频对番茄生长影响的成果。由图可知，经 2200Hz 的声波处理后的番茄对水份、磷元素和氮元素的吸收能力明显增强，显示出良好的生长态势^[1]。本课题的研究表明，灰霉菌在 2000Hz 声频处理后的致病性同样是比较强的（图 9），结合 5.2 的猜想，植物和真菌在此时的变化可能都是细胞分裂增速所造成的。

此外，Liu 等人对菊花的研究表明，最有益菊花生长的声频波段是 800Hz^[12]。恰好，本课题研究结果表明，灰霉菌在 800Hz 的影响下致病性是最弱的。因此，如果给菊花施加 800Hz 的声频，不仅能促进菊花的生长，还能降低灰霉菌的致病能力，可以有效防治菊花灰霉病的产生，这是非常符合农业生产的现实需求的。

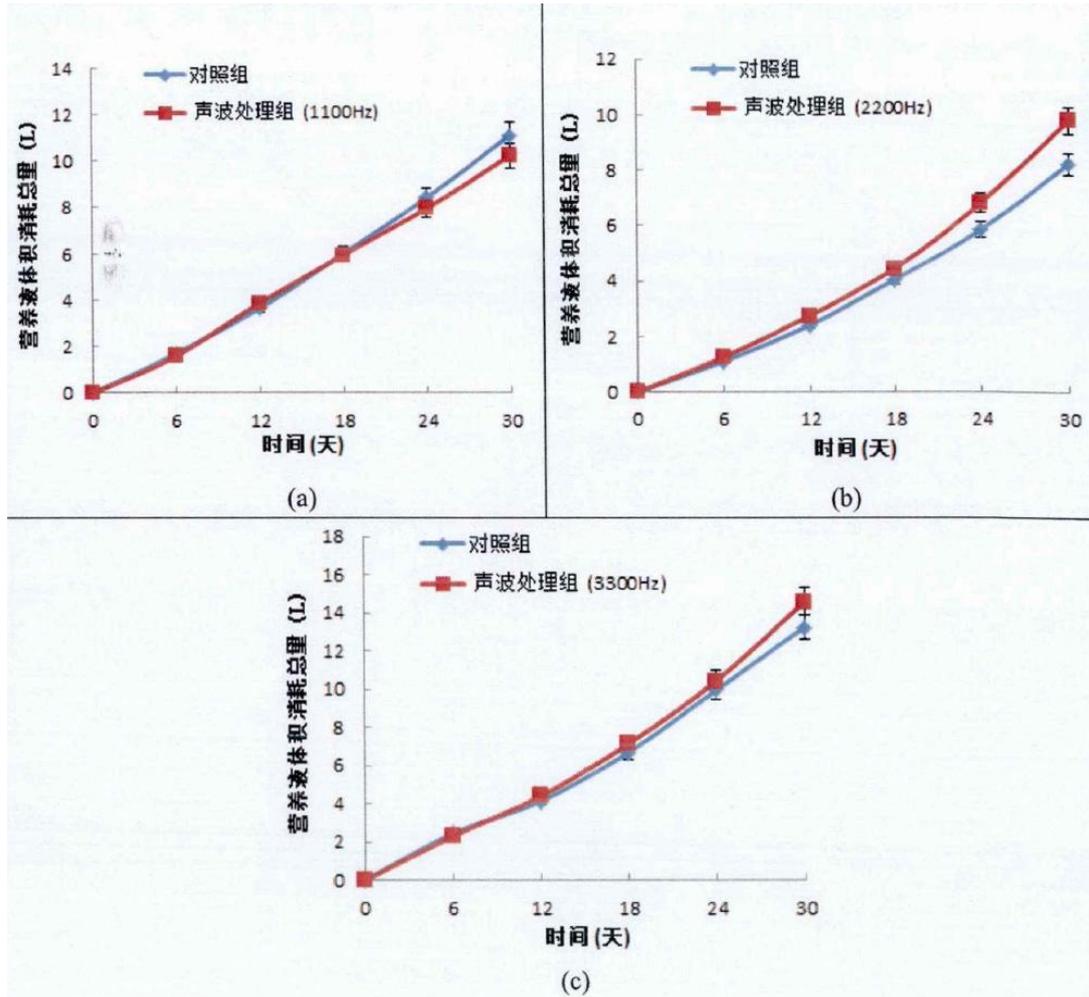


图 14 不同特定声频对水培番茄的影响 (来源于文献[1])

其他植物所适宜的声频也不尽相同,这预示着能够有效抑制不同真菌的声频也很有可能是不同的。但是,如果我们能将二者有机地结合起来,找出既能使植物增产,又能有效抑制真菌的声频,不仅可以丰富植物声频技术抗病性的理论依据,也可以促进农业的发展,这将是一件十分有意义的事情。

6 结论与展望

本课题用响度恒定为 100dB、频率分别为 400Hz、800Hz、1500Hz、2000Hz 的声频施加于灰霉菌,用 100dB、800Hz 的声频施加于青霉菌,用 olympus 显微镜观察了声频处理后真菌孢子形态和浓度变化,用十字划线法测量了真菌声频处理后真菌生长直径的变化,用刺伤接种法观察并测量了声频处理后灰霉菌、青霉

菌对于番茄叶片及柑橘上致病性的大小, 并检测了声频处理后灰霉菌后代生长直径的变化。

研究表明, 各种特定声频对青霉菌、灰霉菌的生长发育和致病性有着明显的抑制效果, 具体效果如下:

1、孢子浓度下降。其中, 800Hz 和 2000Hz 的声频效果最好, 使灰霉菌孢子浓度分别下降了 94.5%和 92.3%,

2、菌落生长直径变小。800Hz 的声频使真菌的直径减小了 75.07%。

3、致病能力减弱。其中以 800Hz 和 1500Hz 的声频效果最好, 病斑直径分别减小了 45.3%和 31%。

4、声频对真菌孢子的形态影响不大。

5、初步设计了声频储存食品的装置, 改进后可应用于市场。

该研究结果对灰霉病、青霉病的防治及将声频防腐技术的应用有一定的指导意义。

鉴于以上结论和实验中的一些不足, 我认为本课题接下来还可以从以下几个方面继续研究:

1、测量灰霉菌的生物量(菌丝鲜重或干重), 以此来验证对 2000Hz 处理组孢子量少、致病性却较强这一反常现象原因的猜想。

2、进一步扩展声频影响真菌的应用范围, 先从有害于番茄的其他真菌做起, 如茄链格孢菌、疫霉菌等等; 再逐步扩展到其他农业作物上。

4、进一步探究真菌受声频影响的作用机理, 探究声频究竟是加快了真菌细胞的分裂, 还是恒定空气压强的变化使真菌受到了影响。看是对真菌致病的哪一过程或基因产生影响。

5、进一步研究以真菌声频技术为原理的杀菌装置, 并做成实物, 希望能投入市场使用形成规模化应用。

7 收获与体会

从“留得枯荷听雨声”的夏末，到“细雨生寒未有霜”的初冬，不知不觉中，我与植物声频技术结缘已有好几个月了。在这之前，我还从未想过，课题研究居然会产生这么多的美妙故事。

现在细细想来，我最主要的收获主要有 5 点：

(1) 事物的两面性

当我最初定下这个课题是，我满心希望的是声频只会抑制真菌、杀菌，让我们和植物一起健健康康得生活。可没曾想，竟然有几个频率段的音频是促进真菌生长的！面对这样的晴天霹雳，起初我是拒绝的。可在指导老师的开导下我知道，原来有很多的真菌对我们人类是有益的，比如能制造青霉素的青霉菌，就挽救了许许多多的生命。促进真菌生长，同样可以为社会造福。凡世间事物，皆有两面性，重要的是你怎么去利用他。通过这次课题研究，我对哲学中的辩证理论理解得更透彻了。

(2) 既要仰望星空，又要脚踏实地

记得刚开始选题的时候，我主要想在物理方面找到自己的兴趣所在。然而，面对整栋宏伟的物理大厦，我常常在选择上显得不知所措，又因知识储备的有限，有时我急得抓耳挠腮也对文献的内容一知半解。如今回想起来，这恐怕是做课题时比较难熬的时段之一。

这时，一篇“植物真的能听懂音乐吗？”的文章引起了我的兴趣。如果仅仅是让植物听听音乐，就能使它长得更壮、更好，那不是天底下最有趣的事情之一吗？好奇心促使我调查了下去。通过文献我知道，已经有一些科学家在从事这方面的研究，并取得了一定的成果。这促使我想到：能否以植物声频技术为原理做一个课题呢？

一开始，我考虑的是这一技术与植物授粉的关系。我曾查到过一份有关海玫木的文献：这种植物有一种特殊的授粉机制，只有在遇到授粉昆虫的特定频率时，它才会弹出花药，以此保障了其授粉的高效性。我由此推测：是否可以施加一种机械力，使得一些因授粉低效而濒临灭绝的植物也产生这样一种机制呢？可惜，由于操作的难度性太高，我不得不放弃了之一相反，转而进行对植物声频技术抗病进行研究。从中我明白了做课题既要有新奇的想法，又要考虑现有的实验

条件和可行性。只有从多方面考虑问题，才能在课题、学习和生活中取得一些成果。

(3) 敢于面对挫折，迎难而上

开题报告、材料准备、撰写实验方法.....在对声频抗病的研究中我逐渐走上了正轨。然而，任何成功都不可能是一帆风顺的。在我就要进入试验阶段的时候，我竟然发现：我的课题竟然有人做过了！那篇《声频调控对水培植物生长效应研究》，详详细细得阐述了前人所做的工作，而有一部分正式我原来想做的这对于那时的我来说，可真是晴天霹雳啊！这就好比登山，你已经攀登了许久，已经为此付出了卓绝的努力，可就在你认为即将达到山巅之时，你却发现你选择了一条错误的道路！所幸，所幸，在老师和父母的指导与关爱以及教授的点拨下，我不断探索，最终决定在原有课题的基础上做出一些改变，将声频施加的对象从植物转变成了真菌，从而来到了一个全新的领域。由此，我的课题研究焕发了新春。

(4) 精益求精的科学态度

在课题研究过程中，我也碰到过许许多多的挫折，如孢子洗不出来、实验结果与预期不符、得不到教授认可、实验全部推倒重来等等。但在每一次失败的背后，看似是我需要做更多、更烦的工作，但其实，这些对我的实验操作技能和精益求精的科学态度都有很大的提升。在这方天地，我终于真切地体会到了“失败乃成功之母”的要义。

(5) “闲事”与“正事”的有机结合

最近，在学校的组织下，我有幸与同济大学的物理教授进行了一次交流。在这次讨论过程中，我对植物声频技术的原理产生了兴趣：声波在一定的条件下会产生驻波，可否是因为植物内产生的驻波将能量储存在植物体内，转化成植物的热能或化学能？又或是声波传播过程中会使空间各处的空气压强产生起伏变化。而这引起了植物细胞分裂的加速？

这些与我课题有关的、有趣的知识，虽然现在还不是我课题研究的主方向，但在讨论的过程中，我明白了学科融合的必要性和优缺点，收获颇丰。

参考文献

- [1] 蔡卫明. 声频调控对水培植物生长效应的研究. 浙江大学
- [2] 侯天侦,李保明,王明亮等. 植物声频控制技术在设施蔬菜生产中的应用.
- [3] 李涛, 侯月霞. 流式细胞术分析强声波对植物细胞周期的影响.
- [4] 魏进民. 声波刺激对铁皮石斛过氧化物酶同工酶基因表达的影响
- [5] 孙晓军. 不同杀菌剂及混剂对番茄灰霉病菌的室内抑制效果研究
- [6] 袁章虎. 灰霉菌抗药性研究进展
- [7] 郑瑞生,王则金. 食品物理冷杀菌技术研究进展.
- [8]刘波,黄志明. 二氧化氯在食物储存中的应用研究.
- [9] 李丹. 超声波杀菌在食品中的研究现状.
- [10] 郭娟华,陈楚英,周梦娇等. 防治柑橘青霉病生防菌的分离筛选及鉴定.中国园艺学会2012年学术年会
- [11] 肖青青,王 甦,段劲生. 音频控制技术在现代农业中的功能研究进展.
- [12]逢焕成 , 杨劲松, 谢晓红.氯化钠胁迫下施氮对冬小麦生长发育及体内氯、钠离子积累的影响.
- [13] 冯应海. 改良透明胶带法在丝状真菌形态观察中的应用.
- [14] Liu Yiyao , Wang Bochu , Long Xuefeng et al. Effects of sound field on the growth of *Chrysanthemum callus*.Colloids and Surfaces B.
- [15] 王向阳,潘炎,吕丽. 扩展青霉菌侵染采后刺伤苹果的特性研究.中国食品学报.
- [16] 李进. 一株蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 对几种重要植物病原真菌的抑制作用研究
- [17] T. Z. Hou ,R. E. Mooneyham.Applied Studies of Plant Meridian System: I.
The Effect of Agri-Wave Technology on Yield and Quality of Tomato.
- [18] W. Cai, H. He,2S. Zhu, N. Wang.Biological Effect of Audible Sound Control on Mung Bean (*Vigna radiate*) Sprout.BioMed Research International.American Journal of Chinese Medicine
- [19] 方中达. 植病研究方法. 中国农业出版社

致 谢

感谢指导老师给与我的帮助与启迪, 感谢学校在实验场地和仪器药品方面的大力支持, 感谢上海青少年科学社为我们搭建平台, 让我们可以与教授交流课题, 感谢多位教授的点拨与指导, 感谢父母给我的精神鼓励与物质帮助, 感谢班主任和同学们的鼓励..... 在此对所有帮助过我的人表示最衷心的感谢。

学术诚信声明

本人所呈交的参赛论文, 实在指导老师的指导下独立完成。研究工作所取得的成果、数据、图片资料均真实可靠。除文中已注明引用的内容外, 不包含任何其他人或集体已经发表或撰写过的作品或成果。对本论文的研究做出重要贡献的个人和集体, 均已在文中以明确的方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

本人签名: 谢承翰



日期: 2018年9月10日