

## 讨 论

1. 正如前述,利用植物根器官的平板培养进行 VA 菌根真菌的接种试验,过去已有报道,本试验研究采用根器官与 VA 菌根真菌和根瘤菌分离培养并获得成功。利用这一方法,可以在有限的空间,无需照明,在黑暗条件下,就能进行 VA 菌根和根瘤菌的接种试验,能以固体培养基代替植物的地上部分,为了解宿主的营养对 VA 菌根真菌和根瘤菌的侵染可能造成的影响提供了一条直接研究的途径。

2. 过去一般认为 VA 菌根真菌是不入侵根瘤的,只限于在根的皮层内发展,并向皮层释放从根外吸收来的磷,然后再由根输送给根瘤<sup>[2]</sup>。但从本试验培养的绿豆根器官上看到,VA 菌根真菌不仅侵入根的皮层,也直接侵入根瘤的内部。我们还在盆栽三叶草和自然生长的银合欢的根上,同样发现这一现象,当根瘤刚开始形成,就有 VA 菌根真菌的入侵,随着根瘤体积的扩大,菌根真菌在整个根瘤内所占空间也逐渐增大。VA 菌根真菌直接侵入根瘤,无疑对加强根瘤菌固氮所需要的磷素营养和提高固氮能力是十分有利的。

3. 本试验中 VA 菌根真菌的侵染率比根瘤菌侵染率低得多,可能与实验装置氧的供应

不足,二氧化碳的浓度过大有关。据 Tacon 等<sup>[8]</sup>用 VA 菌根真菌 *Gl.mosseae* 所做的孢子发芽和菌丝生长的试验表明,空气中氧的分压如果低于 3%,孢子萌发和菌丝生长就要受到抑制,二氧化碳的浓度超过 5% 也同样要引起这一后果。我们设想,如果对本实验的装置加以改进,在橡皮塞上安插一细玻璃管,使内外空气能够交流,VA 菌根真菌对离体培养的根器官侵染率就有可能提高。

## 参 考 文 献

1. 汪洪钢等:微生物学通报 12(2): 49—51,1985。
2. 中国科学院上海植物生理研究所:植物组织和细胞培养,第 190—199 页,科学出版社,1978。
3. Gerdemann J W: *An. Rev. Phytopath* 6: 397—418, 1968.
4. Hepper C M et al.: In *Tissue culture methods for plant pathologists*, ed. Ingram D. S., Helgeson J. P., Blackwell Scientific, Oxford. 167—171, 1980.
5. Mosse B: In *Exploiting the legume-Rhizobium symbiosis in tropical agriculture*, ed. Vincent J. M., Whitney A. S., Bose J., College of tropical agriculture, University of Hawaii Misc. Publ. 275—292, 1977.
6. Mosse B et al.: *Physiol. plant pathol.* 5: 215—223, 1975.
7. Phillips J M et al.: *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 158—161, 1970.
8. Tacon F L et al.: *Can. J. Microbiol.* 29: 1280—1285, 1983.
9. Tinker P B: IN *Endomycorrhizas*, ed. Sanders F. E., Mosse B., Tinker P B Acad. Press, London. 353—371, 1975.

## 一株拟青霉的性状和毒力的研究

方 焕 谋 谭 树 明

(湛江农业专科学校,广东)

**摘要** 本文报道在湛江蔗区一种甘蔗害虫——蔗褐蠹蛾 (*Phragmataecia castaneae* Hübner) 虫尸上分离的一株真菌,初步鉴定为拟青霉 (*Paecilomyces* sp.)。经多年试验证明,该菌对多种甘蔗害虫具有较强的致病力。测试结果显示该菌的菌丝体与冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis*) 的化学成份基本相同。

**关键词** 拟青霉;蔗褐蠹蛾;湛江蔗区;致病力;化学成分

1985 年 6 月,我们从自然死亡的蔗褐蠹蛾 (*Phragmataecia castaneae* Hübner) 虫尸分离到一株真菌,经初步鉴定为拟青霉 (*Paecilo-*

*myces* sp.)。为了查明该菌在生物防治方面的应用可能性,并探讨其潜在的药效成分,我们进行了此项研究。

## 材料与方 法

### (一) 菌种来源

从感病虫尸上分别取其体内组织及孢梗束片段,用无菌操作移植于加有链霉素的 PDA 平板上,25℃ 恒温培养,每天观察,剔除杂菌。5—7 天,挑取组织块边缘长出的白色菌丝体,移植于 PDA 斜面上,25℃ 培养 5—7 天,再进行划线纯化,保存菌种。同时考察病原的形态特征。

### (二) 扫描电镜观察

取在 PDA 上培养 20 天的菌丝索和在虫体上长出的孢梗束顶部 0.8cm 左右的小段,按常规进行固定、脱水、干燥、喷金,用 H3010 扫描电镜 (SEM) 在 2000—10000 倍下进行观察、拍照。扫描电镜由湛江医学院电镜室提供。

### (三) 菌液的制备

用无菌水洗下成熟的孢子粉,稀释成  $1 \times 10^8$  个孢子/ml 的孢子悬液;或将菌丝加玻璃砂磨烂,用无菌水稀释成含有  $1 \times 10^8$  菌丝片段/ml 的菌丝悬液。备用。

### (四) 毒力试验

人工饲养或捕捉五至六龄的寄主幼虫,随机分组,每组 30—100 头,设清水处理作对照。接种时,把菌液(或清水)滴注在蔗头隧道内的寄主昆虫身上,然后恢复其原来的栖息状态,连同蔗头插在湿润清洁的沙土中,保持空气相对湿度 80—90%,3 天后每天观察登记幼虫死亡数。

### (五) 生理特性试验

1. 营养试验:配制 8 种培养基(%):①马铃薯 20,蔗糖 2,磷酸二氢钾 0.3,硫酸镁 0.15,维生素 0.001;②蔗糖 3,天门冬酰胺 0.1,磷酸二氢钾 0.125,硫酸镁 0.03,硫酸亚铁 0.001,硝酸钠 0.05,氯化钾 0.05;③蛋白胨 1,甘油 3,天门冬酰胺 0.1,磷酸氢二钾 0.1,硫酸镁 0.05;④大豆粉 0.4,淀粉 3,磷酸氢二钾 0.1,硫酸镁 0.05,硫酸亚铁 0.01,硝酸钾 0.2,氯化钾 0.05;⑤蛋白胨 0.5,葡萄糖 1,磷酸二氢钾 0.1,硫酸镁 0.05;

⑥酵母膏 0.1,蛋白胨 1,葡萄糖 1,磷酸氢二钾 0.1,硫酸镁 0.05;⑦蛋白胨 1,葡萄糖 1;⑧花生饼粉 1.5,蚕蛹粉 1,蛋白胨 1.5,葡萄糖 2,磷酸二氢钾 0.015,磷酸二氢钠 0.015,硫酸镁 0.01。室温静置浅层培养 15 天,观察其生长情况。

2. 温度试验:在萨氏培养基平板上分别定量接种,待发菌后(2 天),分别置于 15℃、20℃、25℃、28℃、33℃、38℃ 培养 2 天,测量菌丝体的生长速度。

3. pH 值试验:将菌种分别接入 pH3—10 的萨氏培养液中,25℃ 培养 10 天,观察菌丝体生长情况。

4. 生长曲线的测定:在萨氏培养基平板上(pH6)定量接种,6 个重复,25℃ 恒温培养,2 天后,每天测量菌落直径,连续 7 天,然后根据结果绘出生长曲线。

### (六) 化学成分测试(与冬虫夏草比较)

将 *Paecilomyces* sp. 的菌丝体于 70—80℃ 烘 3 小时,再放在 45℃ 烘箱内 3 天,然后取出剪碎,磨粉。称取 0.5g,在索氏抽提器中用 60ml 乙醚抽提 2.5 小时,所余滤渣再用 60ml 乙醇抽提 3 小时,分别将乙醚、乙醇提取液浓缩至干,再分别用 3.5ml 乙醚和 10ml 水溶解,两液放冰箱备用。用同样方法制取冬虫夏草的样品,并配制 1mg/ml 的甘露醇水溶液作对照。

将上述三个样品用玻璃毛细管(或注射器)点样在薄层层析板上(每个样品 10 $\mu$ l)。层析板的制备:用硅胶 G(250 目)和 0.75% 羧甲基纤维素钠制成。①玻片规格 8 × 18cm,用硅胶 G2—3g,加 0.75% 羧甲基纤维素钠 11ml,铺平。②玻片规格 5 × 15cm,用硅胶 G0.7—1g,加 0.75% 羧甲基纤维素钠 3.5ml,铺平。热风吹干后,在 115℃ 烘 30 分钟,取出置于干燥器中,冷却备用。展开剂为醋酸乙酯:吡啶:水(7:2:1)。

显色剂为 1% 高锰酸钾水溶液。

## 试验结果

### (一) 形态特征

在马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)平板上, 25℃培养7天, 菌落直径 20—25mm, 高约 8mm, 圆形, 洁白茸状。其中央区菌丝凸起呈圆台形, 直径 14—17mm, 高 2—3mm, 整个菌落酷似一顶白色绒帽。菌落背面中央区显淡褐色, 外周浅棕色, 色泽不扩散。培养14天, 菌落中央原来凸起部分的菌丝塌陷而成浅盆状, 表面有大量白色孢子堆, 略显干燥。菌丝体有香菇气味。

受感染的寄主幼虫起初体表出现一薄层白色菌丝, 并逐渐形成厚层白色菌褥, 继而从菌褥上长出多条孢梗束。孢梗束白色, 长10—50mm, 粗 1—3mm, 散生或丛生, 分枝或不分枝, 分枝者顶端呈扫帚状; 不分枝者顶端膨大呈粟穗状。孢梗束表面有大量白色孢子粉末(图版I-1—4)。

孢梗束由许多平行排列的菌丝组成。菌丝透明, 近于无色, 宽 1.0—1.7 $\mu$ m。瓶梗大多直接着生在孢梗束外围菌丝上, 也有从球形膨大的

原梗上长出 2—4 个瓶梗的。瓶梗有三种形态: 一种为锥形瓶梗 (5.4—7.2  $\times$  1.2—1.8 $\mu$ m); 另一种为圆肚形瓶梗 (3.6—6.0  $\times$  1.7—2.4 $\mu$ m); 第三种为具有狭长弯曲颈部的长锥形瓶梗 (8.4—18  $\times$  1.0—1.2 $\mu$ m)。分生孢子光滑, 椭圆形, 1.8—3.4  $\times$  1.1—1.8 $\mu$ m, 顶端稍具尖突, 常斜排成链(图 1, 图版I-5—7)。

## (二) 生理特征

1. 营养: 菌丝体在 8 种培养基上均能生长。其中 8 号培养基上菌丝洁白浓密, 粗壮茂盛, 生长最佳; 其次为 3 号和 6 号。除 3、6、8 号外, 其余培养基上的菌丝体不够茂盛, 但培养 7 天后都有珊瑚状突起, 并逐渐形成孢梗束, 其中以 5 号和 7 号长出孢梗束最多, 4 号、1 号、2 号顺次减少。试验结果提示, 在菌丝体生长旺盛的培养基上不易形成孢梗束, 产孢量也较少。

2. 温度: 在 10—33℃ 范围内, 菌丝体均能生长, 而以 25℃ 生长最快, 28℃ 次之, 但在 20℃ 左右生长得粗壮旺盛。故其生长适温为 20—25℃。

3. pH 值: 在 pH4—10 范围内均能生长, 但在 pH6—7 时菌苔厚密洁白, 菌丝粗壮, 生长发育最佳。

4. 生长曲线: 从生长曲线看出在萨氏培养基平板上 25℃ 恒温培养, 该菌在第 3 天和第 4 天生长最快, 5 天以后, 生长速度迅速降低。

## (三) 毒力试验

经人工感染的寄主幼虫, 5—10 天后, 死亡率为 96—100%。其中菌丝悬液比孢子悬液的致死率略高, 可能是由于孢子萌发、侵染较慢, 到第 8、9、10 天才赶上和超过菌丝悬液的致死虫口累计数(见表 1)。

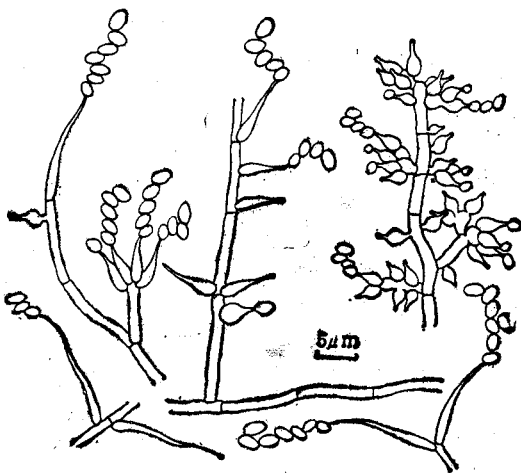


图 1 *Paecilomyces* sp. 的菌丝、瓶梗和分生孢子

表 1 毒力试验结果

处理	浓度 (个、段/ml)	处理 虫数	死亡累计 (d)						死亡率 (%)
			5	6	7	8	9	10	
菌丝悬液	1 $\times$ 10 <sup>8</sup>	100	10	13	15	21	24	17	100
孢子悬液	1 $\times$ 10 <sup>8</sup>	100	5	9	11	20	30	21	96
清水	0	30	0	0	0	0	0	0	0

#### (四) 主要化学成分

硅胶G薄层层析比较结果表明, *Paecilomyces* sp 的菌丝体与医药部门出售的冬虫夏草色谱图基本一致, 提示两者含有基本相同的化学成分<sup>11,21</sup>(见图2)。

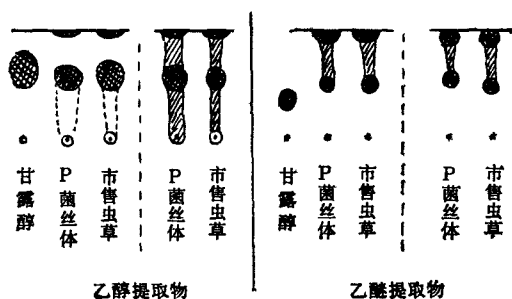


图2 *Paecilomyces* sp 菌丝体与冬虫夏草薄层层析比较  
(P 菌丝体是 *Paecilomyces* sp. 菌丝体的简称)

## 讨 论

1 从形态特征考察, 寄生于蔗褐蠹蛾的这株 *Paecilomyces* sp. 与拟青霉属的已知种比较<sup>3-7</sup>, 它有拟球形的原梗, 其上着生2—4个瓶梗; 瓶梗除锥形瓶状者外, 还有圆肚形瓶状和

具有狭长弯曲颈部的长锥形瓶梗。其瓶梗孢子的形状和量度也与其近似种中国拟青霉 (*P sinensis*)、粉拟青霉 (*P forinosus*) 有差异, 加上寄主不同, 所以该菌可能是一新种, 尚待进一步考证。

2 本文报道的 *Paecilomyces* sp 对蔗褐蠹蛾有很强的致病力, 同时, 我们发现它对甘蔗条螟、白螟以及菜青虫、蚜虫也有较强的侵染力。特别是它生活力强, 适应性广, 易于培养, 孢子丰富, 容易扩散, 在生物防治中显示出颇有希望的应用前景。

3 化学成分测试结果表明, 本试验菌的菌丝体, 与医药部门出售的冬虫夏草有着基本相同的化学成分。提示它具有潜在的药用价值。

## 参 考 文 献

1. 中国医学科学院药物研究所编: 中草药有效成分的研究 (第一分册), 11 页, 人民出版社, 1972。
2. 中国药典, 1985 年版二部, 60 页, 1985。
3. Brown AHS & Smith G *Trans Brit Mycol Soc.* 40(1) 17—89, 1957
4. Samson RA *Stud Mycol* 6 58, 1974
5. 梁宗琦: 植物病理学报, 11(4), 9—16, 1981。
6. 陈庆涛: 真菌学报, 3(1): 24—28, 1984。
7. 陈庆涛: 真菌学报, 3(2): 109—112, 1984。

## 平菇属中一新杂交种及双亲酯酶同工酶的比较研究

居中华\* 陆佩洪 何强泰

(南京师范大学细胞遗传教研组)

**摘要** 采用聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳和薄层等电聚焦电泳法, 以单孢杂交筛选的平菇属中一新杂交种和双亲株[佛罗里达侧耳 (*Pleurotus florida*) 和姬菇 (*Pleurotus* sp)] 为材料, 对三种平菇子实体的酯酶同工酶进行比较, 结果表明: ①三种平菇子实体的酯酶同工酶酶谱丰富, 酶带多, 菌种酶谱稳定特异, 不受环境条件、栽培方式和采样时间的影响, 可作为菌种选育、检测和鉴定的有效指标。②杂交种的酯酶同工酶酶谱体现了双亲的酯酶同工酶基因的杂交组合, 一部分酶带可在佛罗里达侧耳中出现, 另一部分酶带在姬菇中出现。酶谱中出现了典型的互补酶带。③不同的发育阶段中的子实体酯酶同工酶酶带基本相同, 而酶活性变化较大。

**关键词** 酯酶同工酶, 杂交种; 佛罗里达侧耳, 姬菇, 电泳

目前, 有关食用菌不同种属和不同发育期同工酶的研究很多<sup>11</sup>, 但食用菌的杂交种和双亲的同工酶比较分析尚未见报道, 本文采用聚

丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳和薄层等电聚焦电

\* 现在扬州医学院生物教研组工作。