

## 鲁保一号菌的菌种退化\*

林伯茎 聂征 郭恒聪

(宁夏农学院)

我们在研究用鲁保一号 (*Gleosporium* sp.) 防治菟丝子时,发现这种真菌很不稳定。从严重发病的菟丝子上分离到的菌株,经多代培养后,菌落由桔红转为黄绿,逐渐产生气生菌丝,孢子不整齐,发芽率低,产孢量下降,致病力降低,甚至完全丧失生产使用价值。经试验发现并证明,这种真菌经培养多代后,由于一些核产生突变,就形成了由亲代类型(I型)和突变类型(II型)两种类型核组成的菌株。在传代过程中,同一菌株中这两种核的比例很不稳定,致病力低的突变类型核有逐渐上升的趋势<sup>[1-3]</sup>,这是鲁保一号菌种退化的主要原因。实验结果如下。

## 材料和方法

从山东引入的鲁保一号菌株,1974年在防治菟丝子过程中,我们从严重发病的菟丝子上分离出单孢子繁殖的菌株(代号83)。83号菌株的孢子用碱性品红<sup>[4]</sup>染色后,检查4,000个孢子,没有发现双核,即全部为单核孢子。在1%明胶悬滴培养时,发现在发芽的孢子之间有联结现象<sup>[5]</sup>。

将上述83号菌株在马铃薯黄豆粉培养基上5次转管后,保存于4℃冰箱中做为原始菌株。一年后进行单孢分离,发现除和亲代类型相同的孢子(I型)外,还有和亲代有明显不同的另一型孢子(II型)。

## 结 果

## 一、两型孢子在培养性状和形态上的区别

1. 两型孢子的培养性状: 采用的培养基有二种。1号培养基是马铃薯、黄豆粉培养基,2号培养基是蛋白胨、豆饼粉培养基。两型孢子

在这二种培养基上,28℃下培养一星期,形成的菌落有较明显的区别<sup>[5]</sup>。

两型孢子在1号培养基上经7代培养性状无变化。

2. 两型孢子的大小: 两型孢子分别接种在1号培养基上,在28℃下,培养5天后进行测量,每型各测200个孢子,其平均大小和变异幅度见表1。

表1 两型孢子的大小和变异幅度

| 孢子型 | 平均长×宽(微米)  | 长(微米)       | 宽(微米)      |
|-----|------------|-------------|------------|
| I   | 18.27×5.30 | 10.60×26.50 | 4.24—10.60 |
| II  | 14.95×5.71 | 7.95×22.26  | 4.24—10.60 |

将200个孢子的长度分组进行统计,其结果见表2和图1。

由图1可以看出I型孢子大部分集中于第3—8组即12.07—22.37(微米),而II型孢子大部分集中于第3—6组即12.07—18.25(微米)。

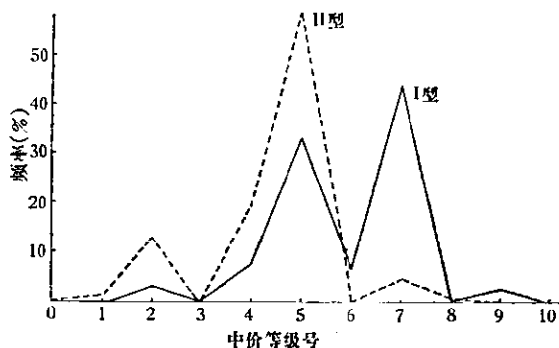


图1 两型孢子长度在各等级中所占的频率\*

\* I型应为单峰曲线,图1中是一次测定的实际曲线,其双峰系由试验误差造成。

\* 本文原稿曾两度经北京农业大学俞大维老师审阅和指正。

表 2 两型孢子长在各等级中所占的频率

| 等级号 | 频率等级<br>(微米) | 中价    | 各等级孢子的次数和所占频率 |       |      |       |
|-----|--------------|-------|---------------|-------|------|-------|
|     |              |       | I 型           |       | II 型 |       |
|     |              |       | 次数            | 频率(%) | 次数   | 频率(%) |
| 1   | 6.92—8.98    | 7.95  | 0             | 0     | 3    | 1.5   |
| 2   | 8.98—11.04   | 10.01 | 7             | 3.5   | 26   | 13.0  |
| 3   | 11.04—13.10  | 12.07 | 0             | 0     | 1    | 0.5   |
| 4   | 13.10—15.16  | 14.13 | 16            | 8.0   | 40   | 20.0  |
| 5   | 15.16—17.22  | 16.19 | 66            | 33.0  | 116  | 58.0  |
| 6   | 17.22—19.28  | 18.25 | 15            | 7.5   | 3    | 1.5   |
| 7   | 19.28—21.34  | 20.31 | 89            | 44.5  | 10   | 5.0   |
| 8   | 21.34—23.40  | 22.37 | 1             | 0.5   | 1    | 0.5   |
| 9   | 23.40—25.46  | 24.43 | 5             | 2.5   | 0    | 0     |
| 10  | 25.46—27.52  | 26.69 | 1             | 0.5   | 0    | 0     |
| 总 计 |              |       | 200           | 100   | 200  | 100   |

## 二、两型孢子在生产性状上的区别

1. 两型孢子的发芽率: 两型孢子在 1% 明胶悬滴中发芽, 每 2 小时检查一次发芽情况。每次观察三个悬滴中的 10 个视野, 计算平均发芽率, 结果见表 3 和表 4。

表 3 两型孢子的发芽趋势比较\*

| 孢子类型 | 观察时间<br>(小时) | 孢子发芽率(%) |       |       |
|------|--------------|----------|-------|-------|
|      |              | 重复 I     | 重复 II | 平均数   |
| I 型  | 2            | 0        | 0     | 0     |
|      | 4            | 0        | 0     | 0     |
|      | 6            | 0.19     | 0     | 0.10  |
|      | 8            | 34.78    | 47.67 | 41.23 |
|      | 10           | 85.97    | 90.07 | 88.02 |
|      | 12           | 88.85    | 89.76 | 89.41 |
|      | 14           | 90.75    | 92.14 | 91.45 |
| II 型 | 2            | 0        | 0     | 0     |
|      | 4            | 0.22     | 0     | 0.11  |
|      | 6            | 13.03    | 2.28  | 7.66  |
|      | 8            | 45.79    | 58.16 | 51.98 |
|      | 10           | 45.00    | 62.16 | 53.63 |
|      | 12           | 60.76    | 62.25 | 61.51 |
|      | 14           | 60.34    | 69.12 | 64.98 |

\* 16 小时后子代孢子已成熟, 观察无法继续进行。

表 6 两型菌株的产孢量

| 重 复      |            | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 总和    | 平 均        |
|----------|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|------------|
| 产孢量(亿/克) | I 型 $X_1$  | 16.7 | 17.8 | 26.6 | 19.0 | 24.6 | 34.2 | 18.3 | 12.7 | 32.4 | 20.4 | 222.7 | $X_1=22.3$ |
|          | II 型 $X_2$ | 6.9  | 8.1  | 5.4  | 4.8  | 10.2 | 5.8  | 6.9  | 4.8  | 8.5  | 6.6  | 68.0  | $X_2=6.8$  |

表 4 两型孢子发芽率比较

| 重 复 | 发 芽 率 (%)    |               |
|-----|--------------|---------------|
|     | I 型( $X_1$ ) | II 型( $X_2$ ) |
| 1   | 90.75        | 60.34         |
| 2   | 92.14        | 69.62         |
| 3   | 95.23        | 61.92         |
| 总数  | 278.12       | 191.88        |
| 平均  | $X_1=92.71$  | $X_2=63.96$   |

当  $df = 2$ ,  $t = 6.30$ ,  $0.01 < P < 0.05$ , 统计结果表明, 两型孢子发芽率差异显著, I 型孢子的发芽率确比 II 型为高。

2. 两型孢子的致病力: 将两型孢子分别制成 250 万个/毫升的孢子悬浮液, 接种于健康的菟丝子芽尖上, 每皿 10 株, 第一批 6 次重复, 第二、三批 5 次重复, 皆以清水接种为对照, 结果见表 5。

当  $df = 2$ ,  $t = 5.95$ ,  $0.01 < P < 0.05$ , 统计结果说明两型孢子的致病力差异显著。I 型确比 II 型致病力高。

表 5 两型孢子致病力的比较\*

| 重 复 | 发 病 率 (%)    |             |               |             |
|-----|--------------|-------------|---------------|-------------|
|     | I 型( $X_1$ ) |             | II 型( $X_2$ ) |             |
|     | 48小时         | 72小时        | 48小时          | 72小时        |
| 1   | 89.65        | 96.22       | 31.65         | 72.50       |
| 2   | 88.00        | 94.00       | 56.00         | 74.00       |
| 3   | 94.00        | 96.00       | 60.00         | 60.00       |
| 总和  |              | 286.22      |               | 212.50      |
| 平均  |              | $X_1=95.41$ |               | $X_2=70.83$ |

\* 对照没有发病。

将两型分别接种后, 发病菌株经过再分离, 仍获得原类型。经过三次在寄主植株上营寄生生活后, 没有动摇其稳定性。

3. 两型菌株的产孢量: 在含 80% 麸皮的固体发酵培养基上, 分别将相同数量的两型孢子接种培养后, 计算其产孢量, 结果见表 6。

当  $df = 9, t = 3.18, 0.01 < P < 0.05$ , 表 6 表明两型菌株的产孢量差异显著。I 型菌株的产孢量比 II 型高 3.3 倍。

三、83号菌株在两种培养基上各代的两型分化

1. 在马铃薯、黄豆粉培养基上：将 83 号原始菌株和保存一年、二年和三年后的 83 号菌株分别进行单孢子分离，单孢子分离采用明胶滴皿法<sup>[5]</sup>，分离结果见表 7。

从表 7 可以明显看出：随着转管次数的增加，II 型孢子逐渐在数量上占优势，即使是在 4℃ 的冰箱中，这种变化也不可避免。

表 7 83 菌株不同菌龄两型孢子的比例

| 菌龄(年) | 转管次数 | 两型孢子所占的比例(%) |      | 分离单孢子数(个) |
|-------|------|--------------|------|-----------|
|       |      | I 型          | II 型 |           |
| 原始菌株  | 5    | 100.0        | 0    | 210       |
| 1     | 9    | 97.5         | 2.5  | 160       |
| 2     | 13   | 79.6         | 20.4 | 388       |
| 3     | 17   | 3.8          | 96.2 | 160       |

2. 在 Richard 培养基上<sup>[6]</sup>：为了使孢子从 I 型到 II 型的变异加速，我们采用含盐分较高的 Richard 培养基，接种原始菌株 83 号，在 28℃ 下培养一周后，放于室温下，每月转管一次，转管后一星期进行单孢分离，其结果见表 8。从表 8 来看，由于高盐分和常温的作用，3 个月就产生了 II 型。表中 4 个月比 3 个月变异反而减少，可能是试验误差。

表 8 在 Richard 培养基上两型孢子的比例

| 菌龄(月) | 两型孢子所占的比率(%) |      | 分离单孢子数(个) |
|-------|--------------|------|-----------|
|       | I 型          | II 型 |           |
| 原始菌株  | 100          | 0    | 115       |
| 1     | 100          | 0    | 92        |
| 2     | 100          | 0    | 160       |
| 3     | 93.1         | 6.9  | 89        |
| 4     | 97.7         | 2.3  | 128       |

此外，我们还将退化的菌株进行了单菌丝尖端的分析。将单菌丝尖端形成的菌株进行单孢分离，结果一个菌丝尖端有时也出现有两型

孢子。

小结与讨论

1. 鲁保一号菌致病力强的菌株 83 号的单孢后代(I 型)经过几代人工培养后，出现和亲代有明显差异的类型(II 型)。II 型孢子在培养性状、孢子大小、产孢量和致病力上都不同于 I 型。经过 7 次传代仍保持其相对的稳定性，说明这种变异是由遗传物质的差异造成的。在人工培养中，特别是在较高温度、高盐分的情况下，容易产生这种变异，这是由于人工营养环境起了加速自发突变的作用，又起了选择异型核的作用<sup>[7-11]</sup>。

2. 83 号菌株在人工培养条件下，于第 9 代分离出 I、II 两型孢子以后，随着代数的增加 II 型孢子逐渐在数量上取得优势。这说明鲁保一号菌种退化的原因是在人工培养过程中，多核菌丝个别核的突变，而这种突变核又随传代次数的增加而逐渐取得数量上优势的结果，这可能与它在长期交替地营寄生和腐生生活过程中，对自然选择产生的适应性有关。

3. I 型比 II 型孢子发芽率高，产孢量高，致病力强，因此，在一个菌株内如 I、II 型孢子比例不同，以产孢量为标准的产量和以致病力为标准的防治效果就会表现明显的差异。产孢量和致病力会随着 II 型孢子比率的增高而下降。因此，在生产中必须随时供应 I 型纯系菌种，才能保持较稳定的致病力。

4. 退化到一定程度的菌株中，仍含有一定数量的 I 型孢子。而且实验证明 II 型核在菟丝子上营短期寄生生活很难获得回复突变而产生 I 型核。因此，将退化的菌株接种于菟丝子上，进行复壮后再分离，实际上是通过这个过程达到选择 I 型核的目的。

5. 由于鲁保一号菌(*Gleosporium* sp.)的分生孢子是单核的，而且在其单菌丝的尖端发育成的菌株中又出现有两型孢子，因此它很可能是异核体，但就目前的材料还不能完全证明，尚需进一步研究。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Parmeter, J. R. Jr. W. C. Snyder and R. E. Reichle: *Ann. Rev. of Phytopathology*, 1:51—76, 1963.
- [ 2 ] Dutta, S. K. and E. D. Garber: *Botanical Gazette*, 122: 118—121, 1960.
- [ 3 ] 盛祖嘉: 微生物学通报 1 (4): 34—38, 1974。
- [ 4 ] 俞大绂: 《植物病理学和真菌学汇编 I》, 人民教育出版社, 北京, 1959。
- [ 5 ] 闵幼农、林伯荃、俞大绂: 中国科学 1960, 3: 371—378。
- [ 6 ] Chona, B. L. and M. K. Hingorani: *Phytopathology*, 40:221—227, 1950.
- [ 7 ] Dutta, S. K. and E. D. Garber: *Phytopathology*, 52:35—38, 1962.
- [ 8 ] Chattopadhyay, S. B. and J. G. Dickson: *Phytopathology*, 50:439—442, 1960.
- [ 9 ] Hansen, H. N.: *Mycologia*, 30:442—445, 1938.
- [ 10 ] Misaghi, I. J. and R. G. Grogan: *Phytopathology*, 68(1):29—34, 1978.
- [ 11 ] 西原夏村: 日植病报, 41: 171—175, 1975。