

座壳孢菌株的选育

方祺霞 官云秀 周玉开 胡亚梅 杨淑芳 周悦悦

(北京市农林科学院植物保护研究所,北京)

为了提高座壳孢 (*Aschersonia papillata*) 防治温室白粉虱 (*Trialeurodes vaporariorum*) 的效果,对该菌株进行了常规育种。以野生菌株 A6S 为原始菌株,经自然分离获得 A6S-1 菌株,经人工诱变得到 A6S-256、A6S-393、A6S-504 等菌株。选育的菌株不但保持原菌株的性状,而且适应性更强。在寄生率和产孢量上均显著优于自然分离菌株。

关键词 座壳孢;温室白粉虱;人工突变株

座壳孢属的各个种,是介壳虫 (*Coccidae*) 和白粉虱 (*Aleyodidae*) 上的寄生菌^[1,2]。1977年,为防治北京郊区保护地内温室白粉虱的危害,自四川省北碚柑桔研究所引进座壳孢属的寄生标本。经分离选择得到 A6S 菌株,由中国科学院微生物研究所鉴定为 *Aschersonia papillata* Petch (Petch, 1924—1926)^[3,4]。本文主要报道座壳孢菌株的选育。

材料和方法

(一) 原始菌株

A6S 菌株(四川野生菌株),诱变后已于1980年失活。

(二) 自然分离

在相对湿度(RH)60—70%;温度20℃(昼夜10—30℃)的环境中,喷孢子液于温室白粉虱1—2龄若虫上,20天后选取在若虫上形成的具有典型座壳孢属特征的大的菌孢,加以纯化(又称活体分离)得到的A6S-1菌株作为对照菌株。

(三) 人工诱变

1. 用 Co^{60} 产生的 γ -射线3、5、7万伦琴分别处理由pH值5.8的磷酸缓冲液制备的孢子液(1.9×10^4 个/ml),并用活体分离优势菌孢。

2. 紫外线(缩写UV):GW型30瓦紫外灯,照距30cm,照射时间为60、80、100、120、140、160、180秒等。生理盐水制备孢子液(6.5×10^4

个/ml),分别用 6.5×10^3 个孢子分离于7.5%的麦芽汁琼脂平板,重复4次。25℃培养20天。结果只在120和140秒处理的平皿内,出现四个菌落。各照射剂量的死亡率均在99%以上。

3. 复合处理:UV加上RH约30%(在含有20%KOH溶液的密闭容器内)和不同温度的处理,以及不同温度的分离培养等。

(四) 寄生率测定法^[5]

回接到温室白粉虱的若虫后,以典型的寄生菌孢数和未寄生的蛹或已经羽化的蛹壳数计算寄生率。按照二样本秩和检验法检验差异^[6]。

(五) 氮、碳源利用试验

用经过水洗的琼脂制成的平板,分别加入糖或氨基酸。25℃培养14天,观察结果。

(六) 孢子量测定法

匀取15%玉米粉培养物(干制品)3g,水浸24小时,用组织粉碎机粉碎,血球计数板计数,重复4次。

(七) 孢子发芽指数计算法

在直径 21×25 cm的容器内,分别加入25%的KOH溶液或加蒸馏水200ml,密封后置于不同温度,若干时后即成为不同温、湿度的培养缸。将孢子悬浮液涂抹于载玻片的中段,气干后置于上述培养缸内。试验重复三次。在显微镜下每一处

本文于1983年9月20日收到。

本试验承蒙俞大綏教授指导;本院综合发展研究所李健、刘菲等同志检验菌株寄生率的显著性,谨此一并致谢。

理观察三片，每片连续统计 100 个孢子。孢子发芽程度分为 4 级。1 级：孢子萌发或芽管长度为孢子长度的 1/2 以下；2 级：芽管长度为孢子长度的 1/2 至 1 倍；3 级：菌丝长为孢子长度的 2 倍；4 级：菌丝长为孢子长度的 3 倍以上。

$$\text{孢子发芽指数} = \frac{\sum(\text{各级孢子数} \times \text{级数})}{100 \times 4} \times 100\%$$

结 果

(一) 菌株选育程序

以 A6S 菌株为原始菌株，经自然分离

获得 A6S-1 菌株，经人工诱变得得到 A6S-256、A6S-393、A6S-504 菌株。在平均温度 19—25℃，RH 60—70% 的小气候中，这些菌株对于粉虱 1—2 龄若虫的寄生率均在 90% 以上，比 A6S 菌株（寄生率 30%）有大幅度的提高。其中以 Co⁶⁰ 处理、活体选择、低温低湿分离系统获得的 A6S-256、393 菌株为最优(图 1)。

(二) 寄生性

在确定各菌株寄生率具有连续概率分

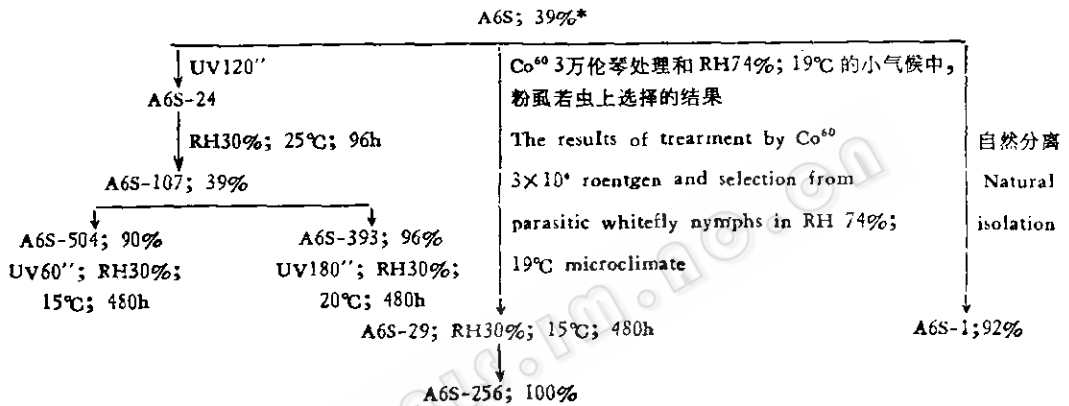


图 1 菌株选育程序

Fig. 1 Scheme of selection of strains

*示该菌株在粉虱若虫上的寄生率。

Its percentages of parasitization to whitefly nymphs.

布的前提下，采用二样本秩和检验 (Wilcoxon) 方法，检验菌株间寄生率的差异性。

设被检验的两组样本各有样点 m 和 n 个 ($m \geq n$)。

假设：两组样本无显著性差异。

1. 将两组样本混合排序。

2. 计算样本组有 m 个样点的秩和记为 T_0 。

T_0 。

3. 计算

$$\mu_T = \frac{m(m+n+1)}{2}$$

$$\sigma_T = \sqrt{\frac{mn(m+n+1)}{12}}$$

4. 若检验函数

表 1 菌株之间寄生率差异的比较

Table 1 Comparison for the difference among the strains in parasitic rate

菌株 Strains	A6S-393	A6S-256	A6S-504	A6S-1 (Control)
A6S-393		T = 651 不显著 No mark	T = 753 显著 Mark	T = 327 显著 Mark
A6S-256			T = 673 显著 Mark	T = 293 显著 Mark
A6S-504				T = 347 显著 Mark
A6S-1 (Control)				

$$\alpha = 0.05 \quad u_\alpha = 1.967$$

$$u = \frac{|T - \mu_T| - 0.5}{\sigma_T} > u_{\alpha/2}$$

即 $\frac{T - \mu_T + 0.5}{\sigma_T} < -u_{\alpha}$ 或

$$\frac{T - \mu_T - 0.5}{\sigma_T} > u_{\alpha}$$

此时,否定原假说,承认两样本有显著差异。

检验结果,人工诱变的 A6S-393、A6S-256、A6S-504 等菌株的寄生率均显著优于自然分离菌株 A6S-1,而 A6S-393、256 菌株又显著优于 A6S-504 菌株,但是, A6S-393 与 A6S-256 菌株之间的寄生率,无显著差异(见表 1)。

(三) 产孢量

表 2 为菌株产孢量的数据,按随机区组试验统计分析^[6],在方差分析中实得菌株的 F 值 $8.685 > F_{0.01} = 6.99$ 为极显著。*t* 测验 (L·S·D 法), L·S·D 0.05 = 32.41; L·S·D 0.01 = 46.57。A6S-256 菌株的产孢量为最高,与 A6S-1、504 菌株

表 2 菌株产孢量的比较

Table 2 Comparison of the strains on their production of pycnospores

菌株 Strains	I	II	III	IV	Tr	\bar{X}	差数 (Quantitv difference)
A6S-256	86	137	68	146	437	109	
A6S-393	57	102	103	81	343	86	23
A6S-1	45	77	32	93	246	62	47* 24
A6S-504	26	38	37	60	161	40	69** 46** 22

* 示显著; ** 示极显著。

* Shows mark; ** Shows great mark.

的产孢量之比达极显著水平。其次, A6S-393 的产孢量显著高于 A6S-504 菌株。

(四) 生活力

表 3 为饥饿培养的结果,人工突变株 A6S-393、256、504 在 15°C 低温和 RH 70% 的小气候中,孢子发芽指数均高于自然分离株 A6S-1,尤其是 A6S-504 菌株。30°C 不利于孢子发芽,却有利于形成菌丝。A6S-393 菌株形成网状菌丝的能力更强,玻片上平均菌落直径为 0.8cm,与 A6S-1 菌株的 0.16cm 相比较增加 4 倍(见

表 3 孢子发芽指数(%)

Table 3 Index (%) of pycnospores germination

菌株 Strains	RH 100%								RH 70%					
	15°C		20°C		25°C		30°C		20°C		25°C		30°C	
	168 (h)	400 (h)	48 (h)	316 (h)	48 (h)	316 (h)	102 (h)	270 (h)	168 (h)	360 (h)	168 (h)	356 (h)	102 (h)	270 (h)
A6S-1	26	39	25	46 菌落 1; φ0.11*	25	44	18	31 菌落 1; φ0.16	25	31	25	39	25	36
A6S-393	27	41	25	39 菌落 1; φ0.26	25	47 菌落 2; φ0.12	25	39 菌落 12; φ0.8	25	43	26	47	25	45
A6S-256	29	42	25	44	25	46	25	32 菌落 1; φ0.42	25	48	26	46	25	44
A6S-504	31	43	25	51	25	57	24	46 菌落 1; φ0.55	25	50	26	55	25	51

* 示玻片观察面形成可见菌落的总数和;φ示菌落的平均直径(cm)

The sum of the observable colonies arised on the observing face of sheet glass and φ shows mean diameter of the colonies of ail.

表 4 菌株的碳源利用

Table 4 Carbohydrates utilization of the strains

碳源 Carbohydrate	自然分离菌株 Natural	人工诱变菌株 Artificial		
	A6S-1	A6S-393	A6S-504	A6S-256
肌醇 Inositol	-	+	-	-
乳糖 Lactose	-	±	-	-
L(+) 树胶醛糖 L(+) Arabinose	+	+	+	+
菊糖 Inulin	-	-	-	-
甘露醇 Mannitol	-	+	-	-
L(+) 鼠李糖 L(+) Rhamnose	-	±	-	-
D(+) 蜜二糖 D(+) Melibios	-	±	-	-
山梨糖 Sorbose	+-++	++	+	+
木糖 Xylose	-	+	-	-
甜醇 Dulcitol	+++	+++	+++	++
棉子糖 Raffinose	+-++	+	-	±
D-果糖 Fructose	+	+	+	+
D-阿拉伯糖 D-Arabinose	-	-	-	-
D-甘露醇 D-Mannose	+	+	+	+
D-葡萄糖 D-Glucose	++	++	++	++
纤维己糖 Cellulose	++	++	++	++
甘油 Glycerol	±	±	±	±
蔗糖 Sucrose	+	+	+	+
麦芽糖 Maltose	++	++	++	++
可溶性淀粉 Soluble starch	-	-	-	-
大豆油 Soya-bean oil	+	+	+	+
芝麻油 Sesame oil	+	+	+	+
空白对照 Control	-	-	-	-

图版 I-3)。

(五) 碳、氮源试验

氮源: 不论自然分离或是人工诱变的菌株, 均只在 28 种氨基酸中的麸氨酸、L-天冬酸和 L-脯氨酸琼脂平板上生长较明显。

碳源: 表 4 的结果表明, 各菌株利用碳源能力有差异。A6S-1 菌株利用 12 种碳源 A6S-393 菌株为 15 种, A6S-256、A6S-504 菌株各为 11 种。

(六) 培养特征

孢子: A6S-1、A6S-393、A6S-504、A6S-256 菌株的孢子大小有差异。在显微镜下, 各测量 40 个孢子, 长×宽的均数, 分别为 14×2.83 、 13.68×2.88 、 $13.08 \times$

2.95 、 $12.98 \times 2.9 \mu\text{m}$ 。经数理统计 t 值测验, 各菌株孢子长度的差异不显著。

菌丝: 在饥饿条件下, A6S-393 菌株菌丝发达并形成许多黑色穗状组织; A6S-256 菌株菌丝短而粗; A6S-504 菌株菌丝短而细; A6S-1 菌株菌丝亦较发达 (图版 I)。

菌落: 菌落黄色, 质地坚硬, 垫状, 表面凹凸不平, 且有细小的突起, 边缘是白色的菌丝带, 具有子座的特征。在查氏琼脂上, 各菌株菌落特征不同。A6S-1 菌株枇杷黄 [I66']^[7]。表面呈大小不均的棒状突起 (模式标本 801)。A6S-393 菌株鹅掌黄 [I55']^[7], 表面呈芽状突起 (模式标本 802)。A6S-504 菌株枇杷黄, 表面呈瓣状突起 (模

式标本 803)。A6S-256 菌株大豆黄 [I35']，表面均呈颗粒状小突起(模式标本 805)，菌落边缘的白色菌丝带狭窄或无(见图版 II)。

模式标本和菌种保存在北京市农林科学院植物保护研究所。

讨 论

Коган 1978 年指出^[8]：“在长期人工培养基上继代繁殖，真菌的毒力显著下降。建议通过虫体上自然分离，以保持种的性状”。我们的研究结果，通过虫体上自然分离，可以大幅度提高菌株的寄生率(图 1)；人工诱变株的寄生率、产孢量和生活力又显著高于自然分离株，其中以 Co⁶⁰ 诱变系统的 A6S-256 号菌株的突变频率更高(表 1—3)。此外，人工突变株的碳氮源利用和形态培养特征等都有一定变异(表 4，图版 I、II)。

宇田川俊一、椿启介等 1977 的描述^[9]：“子座：亚球形、从开始的橙黄色、褐色变成黑色”；再者高日霞等 1981 年也报道^[10]：“待分生孢子完全释放不再产生分生孢子时，子座变黑脱落”。我们在显微镜下经常看到，在饥饿条件(用无菌水制备的孢子悬液涂抹在载玻片上，22—24℃；

饱和相对湿度，培养 30—40 天)下，此菌能产生一种一般培养基短期培养所不能产生的黑色穗状菌丝结构(在培养基上长好的菌苔，置 1—2 年以上，基质长期干固后，亦能看到菌苔上又形成深褐色的菌丝小团。我们认为，这种黑色穗状结构是黑色子囊壳的早期组织，是该菌适应不良环境的组织结构的一部分。A6S-393 菌株形成的黑色穗状物多于其他菌株，说明人工诱变的 A6S-393 菌株，对于环境的适应性更强，有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Mains, E. B.: *J. Insect. Pathol.*, **1**: 43—47, 1959.
- [2] 戴芳澜:《中国真菌总汇》，科学出版社，北京，第 831—832 页，1979。
- [3] 方祺霞等:《昆虫学报》，**26(3)**: 278—286, 1983。
- [4] Peck, T.: *Brit. Mycol. Soc. Trans*, **10**: 191—201, 1925.
- [5] 高玉堂:《环境监测常用统计方法》，原子能出版社，第 129 页，1980。
- [6] 南京农学院主编:《田间试验和统计方法》，农业出版社，北京，第 143 页，1978。
- [7] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组:《链霉菌鉴定手册》，科学出版社，北京，1975。
- [8] Коган, В. Ш.: *Защита Растений*, **1**: 29—31, 1978.
- [9] 宇田川俊一、椿啓介ほか著:《菌类上》p. 635, 講談社サイエンスライフイック, 1977。
- [10] 高日霞等:《微生物学通报》，**8(2)**: 57—58, 1981。

SELECTING STRAINS OF THE FUNGUS *ASCHERSONIA*

Fang Qixia Gong Yunxiu Zhou Yukai Hu Yamei Yang Shufang Zhou Yueyue

(*Institute of Plant Protection, Academy of Agriculture and Forestry Science of Beijing, Beijing*)

Strains of *Aschersonia* were tested in the greenhouse for high virulence against the white fly (*Trialeurodes vaporariorum*). The strain A6S-1 was selected from the wild type collected from Sichuan province. Strains A6S-256, A6S-393, A6S-504 were obtained and selected from the wild type by mutagenic treatment with ultraviolet irradiation. These strains not only retained their original qualities but also acquired

greater adaptability and A6S-256 showed marked superiority in parasitic potency and in sporulation ability. The original wild type collection, strain A6S (1977—1980) was no longer viable.

Key words

Aschersonia; *Trialeurodes vaporariorum*; Artificial mutant