

日本菟丝子的生防研究*

寄生真菌的筛选和利用

廖咏梅 周广泉 周志权 蒋冬荣

(广西植物研究所, 桂林 541006)

摘要 对日本菟丝子有较强致病力的刺盘孢菌, 其在PDA培养基上的特点是, 菌落桔红色, 产孢量大, 气生菌丝稀疏, 不形成分生孢子盘和刚毛。

不太可能筛选出一个对所有寄主上的日本菟丝子都有较强致病力的菌株, 但完全有可能筛选出对其中少数几个主要寄主上的菟丝子均有较强致病力的菌株。

高温高湿和伤口对菌株的侵染有利; 菌株的孢子悬浮液中加入2%蔗糖或少量菟丝子压榨液, 可促使孢子提早萌发并提高其萌发率。

菟丝子的茎蔓尤其幼嫩部分比花穗更易感病。

固体扩大培养基的成分中, 用80%麦麸加20%玉米粉配制较好, 菌株的产孢量大。

关键词 日本菟丝子; 刺盘孢菌

在日本菟丝子(*Cuscuta japonica* Choisy)的生防研究中, 对菌株的筛选结果表明: 具有较强致病力的菌株, 仍然隶属于刺盘孢菌属 *Colletotrichum* Corda^[1, 5] 中的某些种, 同时还观察到, 菌株致病力的强弱, 固然是不同“种”的特性之一, 然而即便是同一个“种”也受诸多因素的制约(另文报道), 就其应用来说, 筛选一个相对多效的菌株并进而提高其侵染力, 是生防中迫切需要解决的问题, 为此, 本文将就上述问题, 汇总成文报告如下。

一、对日本菟丝子有较强致病力的刺盘孢菌菌落的基本特点

先后在不同地区的不同寄主上, 分离出200多号刺盘孢菌菌株, 根据在PDA培养基(马铃薯葡萄糖琼脂培养基)上产孢量的大小, 气生菌丝的多少以及菌落的色泽等特性, 初步分成12个类群^[1, 2, 3], 每个类群选几个代表分别对不同颜色及几个主要寄主上的菟丝子进行接种, 测试其致病力, 结果发现: 凡对日本菟丝子有较强致病力的菌株, 毫无例外地均隶属于具有下列特点的类群^[1, 4, 11]: 菌落致密, 菌丝多紧贴培养基质的表面或埋生, 基面菌丝大量着生分生孢子, 集结成粉红色或桔红色的分生孢子堆, 不形成分生孢子盘和刚毛, 外围有少量的稀疏气生菌丝, 培养后期底部部分或全部变黑, 多呈轮纹状。

从实用的角度看, 上述几个基本特性作为分“类群”的依据还是可行的, 有助于今后对日本菟丝子进行生防菌株的定向筛选研究。

*本研究系国家自然科学基金资助的课题。

二、菌株筛选的可行性选择

取经初测具有较强致病力的菌株, 在 PDA 培养基上培养后, 制成孢子悬浮液, 对不同寄主上和含有不同色素的菟丝子(紫红色和黄色)进行致病性的进一步测试, 方法是: 将待测的健壮菟丝子茎蔓缠绕在铁丝架上, 喷洒供试菌株的孢子悬浮液, 置于盛有清水的搪瓷盘中, 并用大烧杯分别罩起保湿, 每个菌株 3 个重复, 另以不接种同样处理的菟丝子为对照, 在 25—28℃ 条件下, 经一周, 分别检查菟丝子病死百分率, 取其平均值进行比较。测试结果如表 1。

表 1 供试菌株对不同寄主上的日本菟丝子与色泽的致病率(%)

菟丝子的寄主与色泽	菌 株						对照
	22(2)	17b	110f ₃	04-3 ₁	87-1	115h ₂	
冬青、紫红	45.0	30.0	50.0	82.5	80.0	87.5	0
冬青、黄	90.0	85.0	85.0	35.0	82.5	90.0	0
泡桐、黄	100.0	90.0	—	100.0	—	—	0
桂花、黄	75.0	35.0	60.0	55.0	—	90.0	0
粗叶悬钩子、黄	100.0	75.0	—	95.0	—	—	0
夹竹桃、黄	100.0	80.0	—	—	—	—	0
红豆、黄	—	—	80.0	—	—	75.0	0

表 2 不同培养基质对孢子萌发的关系

菌株及其孢子发芽率(%)	17b			22(2)			87-1			14(3)		
	12小时	24小时	36小时	12小时	24小时	36小时	12小时	24小时	36小时	12小时	24小时	36小时
清 水	12.5	59	71	11	54	63	16	74	83	15	44	68
水琼脂	76	96	100	94	98	100	91	98	99	89	97	99
黄豆粉-PDA	98	100	100	98	100	100	98.5	98	100	93	98	99

从表 1 不仅可看出: 不同菌株对含有不同色素的菟丝子致病力不尽相同, 同时对不同寄主上的菟丝子的致病力, 也有明显差异, 显然有其“专化性”。但是日本菟丝子的寄生又是多寄主, 其中有很多还是极有经济价值的林木果树, 因此, 这对生防菌株的筛选和利用, 不是一个有利的因素, 然而可喜的是从表中还可看出, 虽然筛选一个对各种色泽和各种寄主上的菟丝子都具有较强致病力的菌株, 就当前来说, 不是一件容易的事, 可是筛选一个针对主要寄主上的菟丝子还是可行的, 例如, 对含有不同色素特别是含有紫色素的菟丝子来说, 87-1 和 115h₂ 等都具有较强的致病力; 而 22(2)、17b 和 115h₂ 等对供试的几个寄主上的菟丝子都有相对较高的致病力。因此, 对日本菟丝子生防菌种的筛选, 应当面向区内几个主要经济价值

较高的寄主上的菟丝子为主。这是一个可行的明智选择。

三、生防菌株利用中的几个相关因素

1. 孢子的萌发 菌株悬浮液中的孢子萌发速度与萌发表, 都直接和间接地影响其对菟丝子的致病率, 因此我们对孢子萌发的适宜条件进行了探讨。

(1) 孢子的萌发与培养基质的关系

取培养在PDA培养基上的22(2)等四个供试菌株的孢子, 制成孢子悬浮液, 经稀释后, 为保持湿润而不干燥, 分别将5ml移植在清水、水琼脂培养基和黄豆粉-PDA培养基继续培养, 每隔12小时, 镜下检查其萌发率, 共检三次, 每处理重复2次, 每次重复检查3个视野, 取其平均值进行比较, 结果如表2。

试验结果表明: 供试的各菌株在清水中连续培养的孢子萌发率普遍偏低, 特别是在12小时内; 而在水琼脂培养基和黄豆粉PDA培养基上连续培养的孢子发芽率均接近或超过90%。

在镜检中发现, 不同基质培养中的孢子萌发状态亦有所不同, 在清水中继续培养的孢子, 多在一端或两端伸出较短的芽管; 在水琼脂培养基上继续培养的孢子, 伸出的芽管很快就延伸成菌丝, 多为单支(少有分枝), 而在黄豆粉PDA培养基上继续培养的孢子, 不仅很快长成较长的菌丝, 并且大量分枝, 有些分枝的尖端还膨大为次生孢子, 这种现象的出现可能说明: 这些孢子的萌发快时间早在前几个小时就已开始; 而次生孢子的形成可能是, 芽管或由此而延伸成的菌丝, 在找不到寄主借以吸取营养的情况下, 以次生孢子形式延长其寿命, 这种现象我们在*Phytophthora infestans* deBery也发现过^[1]。

在同一时间内, 清水中继续培养的孢子发芽率与在有一定营养而又湿润的培养基上继续培养的孢子发芽率的悬殊差异, 不能简单地用营养来解释, 可能还受着“水浸”的影响, 为了证实这一推测, 我们在菌株22(2)的孢子悬浮液中, 分别加入0.5% NH_4NO_3 、0.5%蔗糖、0.5%葡萄糖、0.5%葡萄糖+0.5% NH_4NO_3 以及0.5%菟丝子压榨液, 每种处理均用100ml水兑成溶液, 以不加添加物为对照, 然后各取5滴, 分散滴于水琼脂培养基上, 剩下的孢子悬浮液静置培养, 经7小时检查, 结果如表3。

表3中可见, 凡继续处于悬浮液状态者, 经7个小时均未发现萌发的孢子, 而把加入不同物质的孢子悬浮液散滴在水琼脂平面培养基上, 则显示出不同物质对孢子萌发的影响, 其中高者可达81—86%, 而清水对照仅为39.0%; 添加菟丝子汁液者, 其萌发率较高, 可能是寄主对病原的刺激效应, 这种现象在植物病理上是较常见的^[4]。同时观察到, 凡孢子萌发早而多的部位, 均是在琼脂平板培养基上悬浮液流淌而无积水的地方, 而有积水部分, 孢子萌发表较小, 说明孢子萌发与空气中氧的供应有关。

这项试验结果充分表明, 菌株孢子悬浮液转加到有适当和适量营养的培养基上并使之处于湿润状态时, 可以提早和增加孢子的萌发, 延长孢子的寿命, 因此也就可能间接提高其侵染有效率。

(2) 不同添加物的浓度对孢子萌发的影响

根据表3所列数据, 添加0.5% NH_4NO_3 和0.5%葡萄糖的发芽率较添加两者之一的孢子发芽率高得多, 这种“互促”的效果, 很可能是“浓度”问题(实质上是渗透压问题), 于

表 3 孢子悬浮液加入不同物质后不同状态下的萌发状况(%)

状 态	0.5% NH ₄ NO ₃	0.5% 葡萄糖	0.5%葡萄糖 +0.5% NH ₄ NO ₃	0.5%菟丝 子压榨液	0.5% 蔗糖	清水
孢子悬浮液滴 在水琼脂培养基上	41.0	47.0	86.0	81.0	60.0	39.0
继续浸在水中	0	0	0	0	0	0

表 4 不同温湿度对菌株侵染的影响

供试条件	温度(℃)	相对湿度 (%)	供试菌株对菟丝子的致病率(%)			
			22(2)	17b	14(3)	对照
高温高湿	28-29	95 以上	90	87	65	0
温暖高湿	23-25	95 以上	93	85	60	0
温暖低湿	23-25	75 左右	40	50	30	0
冷凉高湿	10-20	88 左右	80	70	40	0

是又以蔗糖为添加物，分别在孢子悬浮液（菌株仍为 22(2) 中加入 1%、2%、4%、8% 和 16% 的蔗糖，结果以添加 2% 蔗糖的孢子悬浮液孢子萌发效果最好，三小时开始发芽，五小时萌发率可达 60% 以上，经 7 小时可达 85%，而 1% 和 4% 浓度者，经 7 小时其萌发率分别仅为 37% 和 26%。因此，在孢子悬浮液中加入 2% 蔗糖，可提早萌发，也能提高萌发率，有利于菌株对菟丝子的侵染。

2. 有利于菌株侵染的温湿度条件

为使生防菌株喷施后发挥最大效果而提供依据，我们对喷施后的温湿度条件进行了试验，把接种过的日本菟丝子（冬青上的黄色日本菟丝子，接种方法同前），分别置于高温高湿（温度为 28—29℃，相对湿度 95% 以上）；温暖高湿（23—25℃，95% 以上）；温暖低湿（23—25℃，75% 左右）和冷凉高湿（10—20℃，88%）等四种条件，重复三次，另设不接种的作对照，供试菌株分别为 22(2)、17b 和 14(3)，一个星期后，分别统计其发病率，取其平均值，汇总如表 4。

根据试验结果可看出：相对湿度是菌株侵染的限制因素^[6]，高湿有利于菌株对菟丝子的侵染。

3. 菟丝子茎蔓的伤口和老熟度与被侵染的关系

为创造有利于侵染的条件和提供适宜的施菌期提供依据，我们把冬青上的黄色日本菟丝子，截成带有茎尖和伤口的茎段，圈绕在铁丝架上，进行接种（方法同前），供试菌株分别为 22(2)，87-1，17b 和 12-1a，每处理重复 2 次，共计 30 根，另设不接种的作对照，在 25℃ 和相对湿度 90% 条件下，四天后检查，结果如表 5。

从表 5 所列数据可以看出：绝大多数发病的菟丝子，都是从伤口侵入，部分从茎尖即从幼嫩部分侵入并开始发病，极少从既无伤口又不是幼嫩部位的茎蔓中间开始发病，充分说明

表5 不同菌株对菟丝子的不同状态和部位侵染情况

菌株号	接种根数	伤口发病根数	芽尖发病根数	中段非伤口处有病根数
22(2)	30	28	15	3
87-1	30	19	4	0
17b	30	24	11	1
12-1a	30	25	17	2

注：对照的发病率均为零，表中所列数据有多重侵染现象。

表6 菟丝子花穗和茎蔓的感病性统计

菟丝子的寄主	供试部分	发 病 率 (%)		备 注
		七天	九天	
冬 青	花 穗	25.0	40.0	对照组均未发病
	茎 蔓	80.0	100.0	
桂 花	花 穗	10.0	33.3	
	茎 蔓	30.0	75.0	
金 银 花	花 穗*	50.0	80.0	
	茎 蔓	80.0	100.0	

* 金银花上的菟丝子生长细弱，花穗尤小。

表7 不同成分的培养基组合对22(2)产孢量的影响

培养基号	培养基成分及含量(%)													每克菌剂含孢子量 (亿)
	米糠	木糠	玉米粉	木薯粉	黄豆粉	花生饼	菟丝子汁	马铃薯汁	硫酸铵	硫酸镁	磷酸二氢钾	磷酸钙	麦麸	
1	60	20	10	10										1.57
2	80		10	9.5	0.5									2.24
3	80		10	0	0.5	9.5								2.71
4	63		10		2	10	15							1.83
5	62				2	10		20	0.4	0.05	0.05	0.5		1.06
6			19		1								80	10.51
7			20										80	18.00

表8 不同成分的培养基对产孢量的影响(亿/克)

菌 株	80%麦麸+20%玉米粉	80%麦麸+19%玉米粉	80%麦麸+10%玉米粉
		+1%黄豆粉	+10%木薯粉
22(2)	12.50	8.72	13.50
115h ₂	15.77	13.88	13.60
87-1	16.30	10.10	11.25

喷洒生防菌剂时人为地对菟丝子创造伤口的重要性;同时还提示喷洒菌剂,应在菟丝子幼嫩时期,即恢复生长的早春为宜。

4. 菟丝子茎蔓和花穗的感病性差异

为了抑制菟丝子的有性繁殖,我们对花穗的感病性进行了测定,测定方法是分别将冬青、桂花和金银花上的菟丝子花穗和茎蔓,分别缠绕在铁丝架上(接种方法同前),供试菌株为22(2),重复三次,以不接种为对照,试验结果见表6。

从表6的统计数据看,花穗远比茎蔓更抗病,即便是花穗细弱也比茎蔓更抗病(寄主金银花)。值得提出的是,供试的茎蔓又是充分老熟的阶段,因此,秋季进行生防,不论是从茎蔓的老熟度,还是从抑制有性繁殖的产生来看,都不是理想的时期。

四、固体扩大培养基的筛选

菟丝子的生防菌株,是以孢子为主要侵染体,因此,固体扩大培养基的筛选,必需以产孢量的多少为准。结合我区的农副产品的特点,参考已有的报道^[7,8],我们设计了七个不同成分组合,供试菌株为22(2),在25℃恒温条件下进行筛选,每处理重复二瓶,培养8天后,镜检结果见表7。

根据表7的统计数据看,主要以麦麸和玉米粉组成的第六和第七个培养基组合的产孢量较大,分别为每克含10.51亿和18.00亿,但差异仍较显著,这或是试验中偶然出现的误差,或是黄豆粉有抑制产孢的作用,为此,我们又用22(2),115h₂和87-1菌株作试验,设计了3种仍以麦麸和玉米粉为主的成分组合,试验结果见表8。

综合表7和表8可见,作为产孢量大的固体扩大培养基以由80%麦麸和20%玉米粉配方最好;培养基的成分中加入黄豆粉,即使是1%也对菌株的产孢能力有抑制作用,至于黄豆粉是否对菌株累代致病能力具有稳定的作用,尚需进一步探讨^[10]。

小 结

在菟丝子的生防研究中,就其应用方面来说,初选的菌株在PDA培养基上应是:生长迅速,菌落桔黄色或桔红色分生孢子堆,产孢量大,气生菌丝稀疏;对备选的菌株,其生防对象要目标明确,比如日本菟丝子的色泽及所在寄主等,这样筛选才更为有效。

对生防菌株的应用,应掌握下列几个环节:

1. 商品化的培养基 最好选用88%的新鲜麦麸加20%的玉米粉,不宜添加黄豆粉;
2. 配制的孢子悬浮液,加入2%蔗糖可促使孢子提早萌发并提高萌发率;
3. 施菌适期,最好选在早春菟丝子恢复生长的早期阶段进行;
4. 喷洒前,对菟丝子人为造成伤口是必要的,可提高侵染率,提高防效;
5. 喷洒时,在我区宜选“南风天”进行,可提高防效。

参 考 文 献

- 〔1〕 廖咏梅等, 1991: 日本菟丝子的生防研究初报, 广西植物, 11(1): 82—86.
- 〔2〕 魏景超, 1982: 真菌鉴定手册, 468—476, 上海科技出版社.
- 〔3〕 张中义等, 1988: 植物病原真菌学, 389—423. 四川科学技术出版社.
- 〔4〕 方中达, 1979: 植病研究方法. 农业出版社.
- 〔5〕 张天宇, 1985: 胶孢炭疽菌的菟丝子专化型. 真菌学报, 4(4): 234—239.
- 〔6〕 陈国相, 1982: 生物农药知识, 285—292. 科学出版社.
- 〔7〕 应用微生物展览会编, 1971: 微生物农药和兽药. 科学出版社.
- 〔8〕 陈华癸等, 1979: 微生物学. 农业出版社.
- 〔9〕 周广泉, 林国光, 1965: 马铃薯晚疫病病菌在水和土壤中的侵染力与形态变化的研究, 植物病理学报, 8(1): 11—14
- 〔10〕 高昭远等, 1984: 性状稳定的鲁保一号菌变异株. 植物保护, 10(3): 18.
- 〔11〕 Arx, J. A. von 1957: *Colletotrichum Corda* 属的种. 李建义译自 *Phytopathologische Zeitschrift* Bd29. Heft. 4: 413—468.

STUDIES ON BIOCONTROL OF CUSCUTA JAPONICA THE SCREENING AND USING OF PARASITICAL FUNGI

Liao Yongmei, Zhou Guangquan, Zhou Zhiquan and Jiang Dongrong
(Guangxi Institute of Botany, Guilin 541006)

Abstract The fungus with stronger pathogenicity to *Cuscuta japonica* Choisy is *Colletotrichum* spp., on PDA culture midium, its characteristics is with orange or orange-red colony, high output of spores, thin airhypha, not forming acervuli and setae.

It is not possible enough to screen for a strain which possesses stronger pathogenicity to *C. japonica* parasitizing on all host plants, but it is entirely possible to screen for which on a few main host plants.

High temperature, high humidity and wounds are of benefit to infectivity. In spore suspension 2% sucrose or a littil *C. japonica* squeeze juice are added, the sprouting of spore can be shifted to an earlier time and its sprouting rate can be raised.

The stem of *C. japonica* particularly the tender portion is more susceptible than the inflorescence.

A better solid extension culture midium getting high output of spores of the strain is composed of 80% wheat bran and 20% miaze flour.

Key words *Cuscuta japonica*; *Colletotrichum* spp.