

鲁保一号菌

刘志海 朱全让

LU
BAO
YI
HAO
JUN



山东科学技术出版社

鲁 保 一 号 菌

刘志海 朱全让

山东科学技术出版社

一九八〇年·济南

鲁 保 一 号 苗

刘志海 朱全让

*

山东科学技术出版社出版

山东省新华书店发行

山东新华印刷厂德州厂印刷

*

787×1092毫米32开本 5.75印张 118千字

1980年2月第1版 1980年2月第1次印刷

印数: 1—600

书号 16195·32

定价 0.41 元

目 录

绪 论	(1)
第一章 生物学与侵染特性	(5)
第一节 形态特征及其分类	(5)
第二节 培养特性	(8)
第三节 病理程序与流行观测	(12)
第二章 营养生理与生化	(17)
第一节 酶化学	(17)
第二节 糖代谢	(26)
第三节 蛋白质与核酸代谢	(37)
第四节 氧代谢	(51)
第三章 菌剂固体生产	(59)
第一节 固体浅层发酵生产	(59)
第二节 固体深层发酵生产	(71)
第四章 菌剂液体生产	(78)
第一节 主要生产设备	(78)
第二节 生产工艺	(85)
第三节 生产过程中的灭菌	(91)
第四节 发酵罐接种	(94)
第五节 生产过程中的检验	(95)
第六节 生产中的化学分析	(99)

第五章 菌剂质量检验	(116)
第一节 质量检验标准	(116)
第二节 孢子含量测定	(117)
第三节 孢子活力测定	(120)
第四节 菌剂细度和水分测定	(121)
第六章 菌种复壮、选育与保存	(123)
第一节 菌种复壮	(123)
第二节 菌种选育	(127)
第三节 菌种性状测定	(141)
第四节 菌种保存	(144)
第七章 菌剂应用——防治大豆菟丝子	(148)
第一节 山东几种菟丝子形态与分布	(148)
第二节 大豆菟丝子的生物学特性	(157)
第三节 菌剂的应用方法	(172)

绪 论

鲁保一号菌剂是防治大豆菟丝子的特效生物除草剂。大豆菟丝子是一种恶性寄生杂草，是国际植物病害检疫对象。我国长江、淮河和黄河流域以及东北各省的大豆田里均有发生，为害严重者甚至造成大豆绝产；大豆菟丝子还受害果树林木等；还能传播植物的多种病毒病害和细菌性病害。有些单位曾采用农业措施和化学药剂防治大豆菟丝子，虽取得一定效果，但不能彻底防治其为害。1962年我们在山东省农业科学院植物保护研究所开始探索生物防治大豆菟丝子，进行了大量的田间调查和室内外试验。1963年9月在大豆田里发现药剂防治试验对照区的大豆菟丝子大批死亡，而大豆由前几天的发黄而转青。我们随即把死亡的大豆菟丝子体捣碎涂抹在健康的大豆菟丝子上，两天发病，3天死亡。初步认为这是一种病菌引起的。随后经菌种分离培养、连续10余次的室内和田间接种试验，结果大豆菟丝子幼芽死亡率达90~100%，盆栽防治试验效果为70~95%。当时定名为鲁保一号菌。

经分离获得鲁保一号菌后，先于室内对大豆菟丝子的幼芽进行了人工接种试验，将室内培育的健壮大豆菟丝子幼芽，置于保湿的二重皿内，然后用鲁保一号菌液喷雾接种，孢子浓度控制在低倍镜每视野30个左右，保湿保温24小时，再置于适宜条件下，接种后两天开始发病，3天出现粉红色

孢子堆，5天大豆菟丝子死亡率达95%以上。随后对发病幼芽进行了涂片镜检与人工组织分离，获得了接种以前的病原鲁保一号菌体。1964年初用花盆种植大豆，接种大豆菟丝子，当大豆菟丝子蔓缠绕大豆后，喷雾接种鲁保一号菌，孢子浓度为低倍镜每视野30个左右，保湿24小时，诱发感染，接种后3~5天，大豆菟丝子开始死亡，7—10天死亡率达40~90%，20天死亡率为90~100%。对死亡的大豆菟丝子残株保湿培养和组织分离，也获得了病原鲁保一号菌。同年于春大豆和夏大豆田内进行了小区和较大面积防治对比试验。小区面积20~60平方米，重复3~4次，每小区接种大豆菟丝子5片，以不同防治时间等处理做对比试验，防治效果都在80~90%以上，产量比不防治的增产4.15~5.01倍。较大面积的防治试验，面积0.94亩，对照面积0.43亩，重复两次，防治区有大豆菟丝子12片，对照区有10片。用鲁保一号菌防治后5天大豆菟丝子开始发病，10天死亡50%，15天死亡90%，24天死亡95.5%，仅剩个别花果未死。被大豆菟丝子缠绕的大豆，用鲁保一号菌防治后，平均单株结粒46.2个，折合亩产304.9斤，对照不防治地块平均单株结粒18.7个，折合亩产111.6斤，为不防治的2.73倍。当年7月20日又在齐河县城关公社城关大队第二生产队20亩大豆田内进行了防治示范，大豆田内有大豆菟丝子54片，多数为蔓延盛期，部分已开始结果。7月21日、7月30日和8月4日分别喷鲁保一号菌液一次，8月20日调查，大豆菟丝子死亡率为95~100%，大豆单株平均结粒85个，折合亩产248.2斤，对照不防治地块单株结粒6.5个，折合亩产19斤，为不防治的13倍多。

1965年在兖州县大豆菟丝子发生严重的1000余亩大豆田喷洒每毫升700~1000万孢子的菌液，防治2~3次，定点调查防治效果为91~97.1%；随机取样普查效果为74~85%，防治的单株平均结粒36.2~60.5个，不防治的单株平均结粒3.1~5.4个，平均亩产为不防治的1.6~2.6倍。1966年在山东省5个地区的十几个县，进行了大面积示范，防治效果一般在80~95%。同年江苏省徐州地区农科所，在45亩大豆田内对1200余片大豆菟丝子喷鲁保一号菌液三次，防治效果达90%以上。安徽省五河县在6个公社10个大队，防治大豆菟丝子210亩，防治效果为65~85%。陕西省榆林地区农科所，用鲁保一号菌防治马铃薯上的菟丝子，效果达93~100%。宁夏回族自治区农科所用鲁保一号菌防治胡麻上的菟丝子，走茎死亡91.6%，缠绕茎死亡80.2%。十几年来，鲁保一号菌已在国内20多个省、市、自治区大面积推广应用，防治效果都在85%以上。

随着鲁保一号菌剂防治大豆菟丝子的广泛应用，用量逐渐增多，为了适应生产的需要，1964年又进行了鲁保一号菌剂生产方法的试验，以大豆菟丝子种为原料，用三角瓶培养菌剂，每克培养物含菌5~7亿。1965年进一步扩大为三级培养，即斜面菌种培养→三角瓶菌种培养→土盆或瓷盆培养，生产的菌剂每克含菌10亿左右。1966年以来，先后进行了鲁保一号菌剂固体浅层培养和固体深层通风培养工艺的研究，菌剂的产量和质量都进一步提高，成本降低，做到随生产随应用，保证了田间的防治效果。

自1967年以来，山东省农业科学院先后与化工部、上海医药工业研究院、山东省济南生物药品厂、济宁市化工实验

厂等单位协作，进行了液体深层发酵生产试验，对鲁保一号菌剂的发酵生理与工艺要求进行了系统研究，摸索出了一套液体深层发酵生产的技术措施。

在大量生产和大面积应用鲁保一号菌剂的过程中，由于菌种传代过多，保存不善，以及菌种的变异特性，出现了孢子形态不整齐、对不良环境抵抗力减弱、防治效果降低等不良现象。为了提高菌种质量，又先后试验了大豆菟丝子活体复壮和更换培养基复壮，恢复和提高了菌种的优良性状。有些单位采用紫外线或钴⁶⁰ γ 射线以及化学药剂诱变处理，都取得了明显效果。此外，对菌种的形态分类和营养生理也进行了研究，初步明确了其形态特征和一般生理特性，为生产和应用奠定了理论基础。

鲁保一号菌对大豆、棉花、烟草、洋麻、玉米、高粱、小麦等作物均不能寄生。

由于化学农药污染环境日益严重，生物防治农林病、虫、草害愈来愈受到各国重视。以菌治草已成为植物保护的一项新技术。随着鲁保一号菌杀伤大豆菟丝子的机制研究的发展，鲁保一号菌种退化原因和现代化大吨位发酵工艺和发酵生理的深入研究，必将大大提高鲁保一号菌剂质量，降低产品价格，鲁保一号菌剂也将有更加广阔的前途。

第一章 生物学与侵染特性

鲁保一号菌是属真菌纲半知菌类(Fungi imperfecti)的微生物，具有多细胞、竹节状的菌丝体（营养器官），繁殖体是孢子。真菌的繁殖体有两种：有性孢子和无性孢子。有性孢子是经过核配作用（细胞核的结合），然后经减数分裂而产生的。到目前为止，尚未发现鲁保一号菌的有性世代，它的无性繁殖为分生孢子，在寄主体表。鲁保一号菌防治大豆菟丝子主要利用它的分生孢子。

第一节 形态特征及其分类

一、形态

（一）营养体

鲁保一号菌营养体为菌丝体，具有分隔，分为两部分：一部分是营养菌丝（基质菌丝），伸入培养基内或漫生于培养基表面，摄取营养。初期无色，后期黑褐色，并分泌色素于培养基中；另一部分是气生菌丝，无色，具分隔，多细胞，生长在培养基表面，产生分生孢子，在寄主体表面还可以形成菌丝交织的休眠粒状体，以抵抗不良环境，当环境适宜时，可再产生孢子。

（二）繁殖体

鲁保一号菌的繁殖体是分生孢子，无色、单细胞，长椭圆形（图1），新鲜的分生孢子中具有1~2个油球，衰老

的分生孢子油球变小，并不明显或全部消失。新鲜的分生孢子原生质均匀，以后出现颗粒体，甚至空胞，分生孢子大小因产生方式而不同，产生于菟丝子蔓茎上的孢子一般为 $10.6\sim 31.6\times 2.9\sim 5.6$ 微米，人工培养的分生孢子一般为 $15.2\sim 22.8\times 2.8\sim 7.0$ 微米。在菟丝子蔓茎上菌体先形成子实体——分生孢子

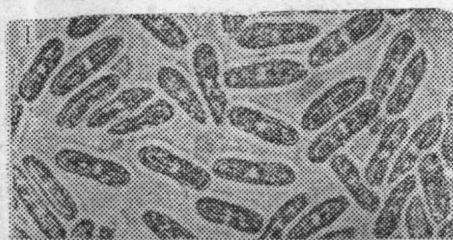


图1 鲁保一号菌孢子形态及萌芽

1.孢子形态 2.孢子萌芽

盘，是由基质与气生菌丝交织形成的盘状体，呈颗粒状，黑色，其上产生分生孢子，粉红色，分生孢子盘周围无黑色刚毛。大豆茎秆上发生的炭疽菌分生孢子盘四周产有黑色刚毛。

二、分 类

有关菟丝子的生物防治，国外曾有报导，

П. П. Архангельский 在 1959 年《菟丝子生物防治方法》一书中，叙述了菟丝子的虫害及病害。他谈到半知菌下列几个属中。Fusarium, Alternaria, Phoma, Colletotrichum, Macrophoma, Cladosporium 等菌的某些种对菟丝子有不同程度的感染。О. А. Рудаков 于 1963 年报导，应用 Alternaria sp 防治苜蓿菟丝子的效果可在 60~80%，但直到目前为止，尚未见到国外大面积应用微生物防治菟丝子的报导。

鲁保一号菌 Colletotrichum gloeosporioides 属于半知菌类盘梗孢目 (Measporiales)，黑盘孢属 (Colletotrichum)，寄生于菟丝子上的微生物的分类检索如下：

- 一、菌丝体不形成子实体，分生孢子着生在疏松的气生菌丝上。
 - 二、分生孢子深色，黑褐色，单细胞圆形或椭圆形…… Cladosporium
 - 二、分生孢子深色，黑褐色，多细胞，具有纵横隔膜，呈砖格状…… Alternaria
- 一、菌丝体发育成子实体，分生孢子生长在子实体内或子实体上。
 - 二、分生孢子生于子实体内，子实体为分生孢子器（分生孢子果）。
 - 三、分生孢子无色，单细胞，大小在 15 微米以下…… Phoma
 - 三、分生孢子无色，单细胞，大小在 15 微米以上…… Macrophoma
 - 二、分生孢子生于子实体上，子实体不形成分生孢子器。

三、分生孢子生于孢子盘中，单细胞，无色，孢子盘一般四周有黑色刚毛 Colletotrichum

三、分生孢子生于一个丘状物上（分生孢子堆），
无色、多细胞，具横隔，呈星月形或镰刀形...
.....Fusarium

鲁保一号菌属于半知菌类，盘梗孢目，盘梗孢科，
Melanconiaceae这一科内，主要有两个属形态相近。

Colletotrichum分生孢子盘黑色，四周具刚毛，孢子
无色，单细胞，卵形或长椭圆形，一般寄生在植物茎秆上。

Gloeosporium分生孢子盘黑色，四周不产生刚毛，孢子
无色，单细胞，卵形或长椭圆形。一般寄生在植物果实
上。根据这两个属的分类学特征，主要区别有两点：第一，
从形态学上，Colletotrichum的分生孢子盘四周着生黑色
针状刚毛，而Gloeosporium不具刚毛。第二，从寄生部位看，
Colletotrichum属寄生于植物茎秆上，而Gloeosporium寄
生于寄主植物的果实上。过去，我们一直沿用Gloeosporium
这一属名，后经中国科学院鉴定，根据寄生特性，应属于
Colletotrichum属内，定名为 Colletotrichum gloeospori-
odes Penz，并确定为此种的一个专化型。

第二节 培养特性

鲁保一号菌属于兼性寄生菌，在培养基上能生长并能完
成发育循环，整个发育过程中固体培养与液体培养所表现的
特征不同。现分述如下：

一、固体培养

鲁保一号菌分生孢子在马铃薯、蔗糖、琼脂培养基上，温度适合时萌发迅速，芽管生长很快。据观察，置于27℃温箱内保温培养4小时开始萌发，6小时萌发率90%以上，8小时芽管形成，并开始分枝，24小时菌丝生长发育成纵横交织稠密的菌丝体，并产生短粗的分生孢子梗，36小时菌丝继续向四周扩散，分生孢子梗簇生分生孢子，48小时菌落呈放射状，上有分泌的桔红色粘液，5~7天后，菌落开始出现黑色小点，并逐渐变黑。

分生孢子在菟丝子茎上遇有适宜的条件，吸水膨大，不久就在分生孢子的一端长出芽管，有时，分生孢子两端同时长出芽管（见图1）。分生孢子萌发后，芽管逐渐增长，孢子内含物流入芽管后，并于芽管顶端生成一个圆形的附着胞。附着胞最初无色，后流入原生质，使其内容物加浓，变为深褐色，起着固定在寄主表面的作用。

分生孢萌发产生附着胞后，在附着胞接触寄主的部分分泌溶解表皮细胞的酶，并产生一定压力，使附着胞底部产生的侵染丝侵入菟丝子体内。当侵染丝侵入细胞后，吸收寄主体内营养，迅速分枝，并穿透细胞进一步扩展，分泌果胶酶以溶解细胞与细胞间的中胶层而使细胞解体，同时分泌毒素杀死细胞，造成溃烂和斑点症状。从侵入到出现症状这一段是潜育期。潜育期的长短与环境条件，尤其是温度关系很大，在高温时期潜育期缩短，一般2~3天。寄主体表出现症状后开始产生孢子，分泌粉红色粘液，呈现炭疽症状，并在其表面形成黑色症状点（分生孢子盘），后期整个茎变黑枯死。

二、液体培养

鲁保一号菌液体培养的菌体生物学特性不同于固体生长。①发酵液中产生分生孢子过程与固体培养不同，在固体培养基上的发育循环是先产生基质菌丝获取营养，然后产生气生菌丝形成网状菌落，顶端先分化成分生孢子枝再簇生分生孢子。在液体培养基内，发育循环短促而不完全，孢子萌发后形成短枝，没有网状菌丝体，也不再进一步分化成分生孢子枝，而是在短枝顶端直接形成分生孢子，当孢子断裂后再形成孢子。②发育循环阶段不明显，一般接种后4小时前为孢子萌发期，4~12小时为营养生长期，12~18小时为菌丝形成孢子期，18~24小时为孢子对数生长期，24小时以后孢子老熟开始自溶。③培养过程中除大量产生分生孢子外，一般并不产生其他子实体（如分生孢子盘），如果营养条件不适宜或通气不够，能出现菌丝体，并相互交织形成菌丝团，成粒状，此时分生孢子产量很少。④液体培养除需供氧充足外，搅拌与形成孢子关系很大。试验证明，旋浆型搅拌叶盘两层，每分钟300转，46小时发酵液菌数每毫升6.3亿；搅拌叶盘一层，每分钟300转，46小时发酵液每毫升仅有2.05~2.5亿；搅拌叶盘两层，每分钟400转，46小时发酵液每毫升4.3亿。高速搅拌能打碎孢子，造成菌体自溶，产胞量反会下降。⑤液体培养接种菌体条件很重要，如果接种体为菌丝而不是孢子（产生异常发酵），发酵液中会大量出现菌丝，而形成孢子很少。相反，如接种体为分生孢子，有利于孢子的产生。孢子培养来源不同，在液体培养中表现的特

性也不同。据试验，用摇瓶液体种子，在100升一级种子罐投料50升，种入1050~2100亿鲁保一号液体种子，发酵终期，发酵液每毫升含菌量为3.5亿；同样条件种入扁瓶培养的固体种子，含孢子量为600~700亿，发酵终期，发酵液每毫升含菌数4.0~6.3亿。从试验看出，固体培养孢子的产孢能力高于液体培养的孢子。

三、生长繁殖条件

(一) 温度

鲁保一号菌分生孢子在15~30℃范围内均能萌发，以28℃萌发最快，生长繁殖最适宜的温度是25~27℃，30℃最适宜分生孢子的形成(孢子形成温度略高于菌丝生长温度)，32℃以上，20℃以下生长缓慢，37℃以上停止生长，分生孢子在50℃10分钟即死亡。对低温的忍耐力较强，在0℃左右能保持萌发力数年，在零下45℃经过3小时，孢子仍不失去萌发力。

(二) 湿度

鲁保一号孢子萌发需要很高的相对湿度，试验证明，100%的相对湿度孢子萌发正常，90%的相对湿度孢子萌发率也不降低。但孢子萌发后，侵染菟丝子必须在相对湿度100%的条件下才能完成。固体培养基含水量以65%左右(绝对含水量)最适宜鲁保一号菌生长繁殖。湿度过高过低生长繁殖不良，分生孢子产量显著下降。

(三) 氧气

鲁保一号菌是一种好氧微生物，在生长繁殖过程中需要充足的氧气(从空气中供氧)，若供气不足，将影响菌体的

正常生长和繁殖。固体培养时，培养基含水量过大或堆放过厚，会造成通气不良，影响正常发育，降低产品质量。液体深层发酵时，需要通入一定量的空气，同时加以搅拌，使其充分混合，以利菌体对氧的吸收利用。

（三）pH值

pH值是指菌体生长发育中酸碱度情况。鲁保一号菌生长与繁殖要求不同的pH值。分生孢子在pH3.5~9.0时均能萌发，pH为5.0发育最快（菌丝生长亦最旺盛），但产生分生孢子以pH6.0时为最好。

第三节 病理程序与流行观测

要提高一种微生物农药的防治效果，对于它的生物学特性、寄生特性、侵染机制，以及流行规律的观察和研究是必不可少的。鲁保一号菌实质上是菟丝子的一种寄生性流行性传染病害，也具有一定的侵染与流行规律和病理程序。

一、萌发与侵染机制

微生物孢子在遇有水滴，并具有适当的温度条件下，一般都可以萌发。对鲁保一号的孢子在萌发过程中的特定条件，如寄主植物体表由于蒸发作用而残留的无机盐类，对萌发的作用等等，应当有所了解。

微生物孢子的萌发试验，一般采用范氏小室悬滴培养法，即在载玻片上用石蜡固定直径1.5~1.8厘米，高0.9~1.0厘米的玻璃环（称范氏小室）。固定方法是将石蜡放在一个容器内加热溶化，趁热将玻璃环的一端浸于石蜡中，然后