

應用示踪原子法研究檸檬梢枯病

病原菌(*Phoma tracheiphila*)与寄主植物

之間的相互關係

Л. А. 康察維里 Р. Я. 基彼阿尼 К. Г. 基卡施維里

近来,生物科学研究工作中,广泛应用放射性同位素法。以往生物学个别部門,业已取得显著成就。其中以真菌学,特别是植物病理学,对本方法的应用,还受一定的限制。无论本国抑或外国研究者所发表的相应著作,还不甚多。

該研究工作的內容,关系到各个問題。例如,闡明真菌有性世代的互相关系(6),弄清標誌过的孢子的傳播途徑(5),病株組織中寄生性微生物的傳播途徑(4),确定寄主植物与寄生菌之間新陈代謝的特性(2),等等。

格魯吉亞社会主义共和国科学院植物保护研究所由于建立生物物理研究法實驗室而开展这一方面的工作。

研究課題是:研究寄生菌 *Phoma tracheiphila* (Petri) Kantsh. et Gikash. Syn. *Deuterophoma tracheiphila* Petri 与其寄主(檸檬树)之間新陈代謝的本性。

这种真菌 *Phoma tracheiphila* 近来在格魯吉亞社会主义共和国亞热带地区严重傳播,故引起檸檬最危險的病害,即聞名的檸檬侵染性梢枯病或称“馬尔西可”。

为了研究上述問題,首先必須制訂应用何种放射性同位素標誌本病原菌的菌絲体的培养法,然后闡明放射性对于真菌的生物学特性和形态学特点的影响(生活力,繁殖器官的发育,对檸檬致病力,等等)。

研究工作的第二阶段包括研究真菌在活的植物有机体中的习性,基本上弄清寄生菌与寄主之間新陈代謝产物的本性及其对檸檬所起作用的机理。

选用放射性同位素时,必須考虑到借助这些同位素能使真菌 *Phoma tracheiphila* 本身起“示踪”作用。我們根据下面理由选用 P^{32} 和 S^{35} :第一,磷和硫是真菌化学組成中的二种基本元素;第二,这些同位

* 本譯文蒙杜雷付院长,赵善欢付院长及柯冲同志审閱斧正,順此致謝——譯者

素具有相当长的半衰期，由此可以保证实验所必要的持续时间。

为了培养标记过的菌丝体，我们利用纯粹培养法。将不同剂量的相应同位素，呈 $\text{Na}_2\text{HP}^{32}\text{O}_4$ 及 $\text{Na}_2\text{S}^{35}\text{O}_4$ 溶液状态，加于不同的人工固体培养基和液体培养基中。

由于标记过的菌丝体实验操作上，必须洗净菌丝，免受基质放射性微粒的机械黏附，同时洗净液体培养基中的菌丝体比固体的容易得多，故采用液体培养基来培养真菌。

我们选用啤酒麦芽汁和 Ролэн 培养液作为培养基。为了制备培养基，加入含糖量10%的蒸馏水于啤酒麦芽汁中。然后，再加入不同剂量的放射性同位素，目的是研究基质的不同比度（25, 50, 100 微居里）

Ролэн 培养液中，加入放射性磷（ $\text{Na}_2\text{HP}^{32}\text{O}_4$ 状态）。这种物质是 Ролэн 培养基中唯一含磷成分。啤酒麦芽汁培养基，除放射性磷外，尚含有稳定性磷。这种分别倒入相应试验皿的培养基，都经高压消毒器灭菌，然后再接种生长在非放射性培养基上的菌丝体或真菌孢子（*Phoma tracheiphila*）。试验皿放于定温箱中，并维持在真菌发育最适宜的温度范围（22° - 25°C）。

每隔三天，观察真菌生长及发育状况。非放射性培养基上培养的真菌，作为对照。观察结果指出，啤酒麦芽汁培养基中真菌的生长，从第二天就开始，及后菌落逐渐长大；至第十二天，出现特有的白色气生菌丝体，带橙黄色色素。

Ролэн培养液中，真菌的生长较啤酒

麦芽汁弱些，同时真菌固有的特征，在这种培养基上，并没有呈现出来。结果，Ролэн培养液后来因不符合我们的要求而被淘汰。但是，应当指出，从 Ролэн培养液第十二天培养状况来看，放射性培养基上生长的真菌比对照组强烈些。

观察放射性基质上 *Phoma tracheiphila* 生长和发育的同时，也曾注意对真菌形态特点的研究。研究过程中，必须弄清楚的，尤其是放射性基质是否影响真菌之生长和发育及其致病力问题。

试验组和对照组的形态分析，同时进行。结果弄清我们所研究的培养基中，不同放射性并不引起形态特征上的明显变化：无论是分生孢子器的抑或菌丝的产生和发育，都与对照组一致。

为了阐明真菌的放射程度，将菌丝体从培养基中小心分离出来，用水冲洗，直至完全失去放射性，并使菌丝体表面不黏附放射性基质。冲洗过的菌丝体，放到 80°C 烘箱中，烘干至固定的重量。以后，借助 Гейгер 计数器测量其放射性。获得的材料折算为10毫克的干燥菌丝体。

试验指出，Ролэн培养液中生长的真菌菌丝体，在所有不同放射比度的培养基中，对于 P^{32} 之吸收，比啤酒麦芽汁培养基上生长的菌丝体多得多（请见表1）。

表 1.

培养基的 放射比度	1 分 鐘 的 脉 冲 数	
	啤酒麦芽汁	Ролэн 培养液
20微居里	8,980	9,560
30 "	9,900	10,240
50 "	12,870	22,262

对 P^{32} 吸收能力的这种差异, 应当认为啤酒麦芽汁培养基中, 不仅含有放射性 P^{32} , 而是也含有稳定性 P^{31} , 后者也被真菌所吸收。至于 Ролэн 培养液上生长的菌丝体, 则仅仅吸收放射性 P^{32} 。

在含有呈硫酸钠状态的 S^{35} 培养基上培养的真菌 *Phoma tracheiphila*, 也获得类似的结果。

因此, 把放射性同位素 S^{35} 和 P^{32} 加进有机体所需的培养基上, 也可获得 *Phoma tracheiphila* 的被标记的菌丝体。

为了阐明放射性在菌丝体重新发育的生长部分再度转移问题, 曾再设置下面试验。

用接种针(鉋针)将含有标记过 S^{35} 的且又洗净的菌丝体, 接种到培养基中非放射性培养基上: 即啤酒麦芽汁培养基, 马铃薯及葡萄糖琼脂。这两种基质上, 标记过的菌丝体的发育与对照组一致(没有标记的真菌非放射性的基质。(第十二天的培养物, 经过小心洗净后, 检验其放射性。根据脉冲数和放射照片确定, 接种标记过菌丝体的, 其放射性会再度转移到重新生长的菌丝体中。

此外, 也曾研究菌丝体放射性转移到其生命活动产物上问题。为此, 将示踪且洗净的菌丝体再放进非放射性培养基上。每隔三天, 进行检验, 并测量其滤液放射性。及后, 培养基放射性逐步上升, 这是因为真菌新陈代谢的放射性产物积累之故。

真菌孢子进行示踪处理, 比较简单; 这里, 我们应用固体琼脂培养基, 其放射比度为 S^{35} 500 微居里。当真菌子实体开始成熟后, 孢子散落到涂有甘油载玻片上。全部孢子脉冲数除以孢子数。检验结

果确定, 孢子堆是含有放射性的, 甚至接种后, 其生长的菌丝体也是含有放射性。

由于 *Phoma tracheiphila* 的孢子, 非常细小, 约 $2.7-4 \times 1$ 微米, 故我们不能确定各个孢子的放射性。为此, 我们又研究粗型 *Helminthosporium gramineum* 的孢子, 其体积为 $80-110 \times 12-20$ 微米。结果阐明每个孢子的放射性约在 100-450 次脉冲/分钟的变幅之间。

下面一组试验, 关系到弄清培养基放射比度极限对真菌生活力之作用问题。

不同放射比度(即 P^{32} 各为 80, 100, 120, 150, 300 微居里和 S^{35} 各为 500, 700, 1000 微居里)的 S^{35} 和 P^{32} 试验指出, 培养基 P^{32} 放射比度达 120 微居里, 真菌发育正常; 而对 S^{35} 来说, 甚至放射比度达 1000 微居里, 也没有观察到真菌生长的抑制现象。 P^{32} 放射比度高于 120 微居里, 真菌仅仅开始生长, 但不发育, 只有培养基放射比度由于自然衰变而降至 120 微居里, 真菌才开始生长。

因此, P^{32} 放射比度近 120 微居里, 应该是真菌 *Phoma tracheiphila* 发育最适宜的放射比度。至于 S^{35} , 则可在 1000 微居里放射比度培养基上十分顺利地培养真菌。

这样, 可以肯定, 真菌 *Phoma tracheiphila* 对同位素表现出极大的稳定性。

为了阐明 γ 射线对真菌生活力的作用, 采用 Co^{60} 1,500,000—2,000,000 伦剂量照射培养 5~6 天的真菌。由于照射结果, 培养物上没有发现宏观变化或微观变化。接种后, 新培养物发育正常(与对照组比较), 这就证实真菌 *Phoma tracheiphila* 极强的稳定性。

此外，也进行标记放射性菌丝体的活力及其在寄主内的习性 (in vivo) 的试验。

首先，必须弄清，*Phoma tracheiphila* 的标记过的放射性的菌丝体是否保存其致病力。后者只有应用标记的菌丝体进行人工感染寄主以及对病株组织中菌丝体之扩展的进一步观察，才能确定。

应用标记的菌丝体 (分别为 P^{32} , S^{35} 和 $P^{32} + S^{35}$) 以人工接种一年生檸檬枝梢。小心洗净后的菌丝体，接种到一年生枝梢的切口，而在接种部位，为了保持一定湿度，用灭菌湿润棉花盖住，然后，再用羊皮纸紮紧。而非放射性菌丝体感染的植株，作为对照。

植物组织中放射性的菌丝体的存在情况，可用 Гейгер 计数器和放射照片来确定。

放射性的测量，可用安于铅室的 TM-20 钟型计数器进行。须要测量的样品，紧压于两片厚度 2mm 的铝板之间；这时，为了计数叶片同一面积的脉冲数，顶层铝板中间要有 2 平方米的小孔，它直联钟型计数器计数表的中央。

人工接种后第三天，便获得首次的试验结果。从而阐明，距离接种部位 35cm 的叶子，变为带放射性的。当然，被感染植株组织内标记的菌丝体在这么短时间 (3 天) 内运转 35cm 的距离，是不能解释这种现象的。

根据 Г. Гаснер [3] 和 Л. А. Канчавели 及 К. Г. Гикашвили 的资料，植物有机体中菌丝体之扩展，达到这样大的速度，是不可能的。对这些事实进行比较，便可肯定：叶子中的放射性是由

新陈代谢的放射性毒质产物之运转所决定。这些新陈代谢产物，也随植物体内上升液流而转移。

为了确定植物有机体中标记的菌丝体扩展的可能性，曾对致病枝梢进行分析。病梢的纵切、横切和斜切都计算其脉冲数及放射照片。正如放射照片所示，底片上变黑强度，随接种部位的远离而从最强逐步减弱。这样强度的分布，不能定出标记菌丝扩展范围与其新陈代谢放射性产物扩展范围之界线。

定出标记菌丝扩展速度与其新陈代谢放射性产物扩展速度或示踪性 S^{35} 的 Na_2SO_4 纯盐扩展速度的界线，在彼此分别接种情况下，是不可能的。所有这种情况的放射性物质的扩展照片，通通一样。

应当指出，第三天观察到最大的放射性，是在顶端嫩叶，而不是下端老叶；至于位于接种部位之下的叶子，全部没有放射性。

另外，也曾设置一些试验，以阐明放射性同位素进入植物体内之可能途径，特别是灌溉，通过根系给檸檬苗木施入 P^{32} ($Na_2H_2P^{32}O_4$ 溶液) 及 S^{35} ($Na_2S^{35}O_4$ 溶液)，灌后第五天，从植株叶片双面测量其活动度。结果发现枝梢上任何叶片都具有放射性。

真菌 *Phoma tracheiphila* 新陈代谢产物对于植物，具有毒害作用。我们的目的是弄清真菌毒原 (毒素) 的物理和化学特性，为此，我们进行下面试验。

为了获得大量的标记 S^{35} 的真菌新陈代谢的毒质产物，故在 2 升立试验瓶中，进行培养。由此获得的菌丝体，用蒸馏水小心洗去麦芽汁，并再次接种到含 2% 葡

葡萄糖溶液的非放射性培养基上。隔3—5天后,再作过滤,从葡萄糖液中取出真菌。含有示踪性真菌新陈代谢产物的滤液毒性,再接种到健株,即接种到健康檸檬的切枝及番茄幼苗,以进行檢驗。从非放射性菌絲体滤液中,檸檬枝梢和番茄幼苗也呈现出中毒象征。

研究毒素物理特性的試驗結果,簡述如下:滤液煮沸30分钟,並未失去其毒性,滤液毒性經受阳光三天的作用,也不改变。滤液蒸发时,其残留干物质容易溶

于醚中; Гумбрин 吸附剂不能从溶液中提出滤液毒质部分。

最后,也曾采用各种不同处理来設置試驗,从研究滤液中毒素抽出物,随后又檢驗其毒性。

試驗証实,不能用醚类提取毒素。必須指出,滤液隔20—30天后便失去其毒性。

为了研究毒素的化学特性,現正开始应用放射性同位素法及色层分离法的工作。(薛 奕譯)

原文題目: К изучению методом меченых атомов взаимоотношения между возбудителем усыхания лимонов (*Phoma racheiphila*) и питающим растением

作者原名: Л. А. Канчавели Р. Я. Кипиани и К. Г. Гикашвили

(譯自“格鲁吉亚社会主义共和国科学院通报”1955 No.7 第 XVI 卷)

参 考 文 献

1. Д. А. Канчавели, К. Д. Гикашвили. Материалы к изучению мальсекко или усыхания лимонных деревьев в Грузинской ССР. Тр. Инст. заш. раст. АН ГССР, т. v, 1948
2. Д. В. Лебедев. Меченые атомы и изучение питания ржавчинных грибов. Природа, 11, 61, 46.
3. G. Gassner. Untersuchungen über das "Mal secco" oder "Kurutan" der Limonbäume. "phytopath. Z." 13, 1:1-90, 40-Bibl. 52, 17
4. I. R. Warren. The use of radioisotopes in determining the distribution of *Bacterium stewartii* Erw. Smith. within corn plants. "phytopath" 41:794-800. 1951.
5. H. E. Wheeler. Single spores and other fungus structures tagged with radiocarbon. "phytopath". 42:23. 1952
6. H. E. Wheeler. The use of C^{14} labeled sucrose for "tagging" fungus mycelium. phytopath 41:38 1951