

棉花枯、黄萎菌在同一培养平面上 生长特性的初步研究*

金锡萱

仇元

(西北农学院植保系)

提 要

常规培养温度(22—26℃)下,枯萎菌在PDA平面上的绝对生长速度是黄萎菌的3—5倍;在培养时间相同的条件下,枯萎菌在PDA培养基上关于温度(10—18℃)的直线生长速度是黄萎菌的4倍左右。在同一PDA平面上生长的枯、黄萎菌之间不表现拮抗作用,枯萎菌可以形成自己的大型分生孢子。黄萎菌亦可形成微菌核。选择性培养基有调节枯、黄萎菌绝对生长速度的比值,促进它们形成各自的特征性菌落的作用。因此,有可能在同一选择性培养基平面上同时鉴别它们。

* * *

随着棉花枯、黄萎病的蔓延、扩展,混生病区不断扩大,混生病株不断增多。由于同时受到这两种病原菌侵染的混生病株的出现,使田间病株的鉴别发生混乱。而利用常规分离镜检鉴别混生病株的方法,又往往将混生病株误检为枯萎病株。1958年,仇元^[1]在检查棉花种籽带轮枝菌时,曾指出:“由于镰刀菌的生长较轮枝菌的快,因此,检查时很受干扰,难以见到轮枝菌。”所以,有必要对这两种病原菌的生长特性进行探讨,为建立鉴别混生病株的方法提供依据。

一、材料和方法

(一)供试菌种: 陕西三原棉花枯、黄萎单孢菌系。

(二)菌饼的制备: 将供试枯、黄萎菌分别接种到PDA上,于24—26℃下培养5天左右,沿菌落边缘挑选生长一致的区段,用内径2毫米的玻璃管打为大小一致的菌饼。

(三)不同温度下两菌生长速度的比较

将枯、黄萎菌饼分别接到PDA平面的中心(培养基定量,15毫升/皿),分别为10、15、20、22、24、25、26、28和30℃等九个温度处理进行培养。每一处理作三皿、

*本文承王树权、袁志发老师指导并审阅文稿;杨之为老师拍摄全部照片,一并致谢。

培养48小时开始记载预定方向上的菌落直径(毫米),以后每24小时记载一次,至168小时,求出每次测得的菌落直径的平均数,计算绝对生长速度和培养时间固定的条件下菌落的直线生长量关于温度的变化率,进行比较。

(四) 两菌共同生长特性的探讨

按如下三种方式在PDA培养基(15毫升/皿)上接种桔、黄萎菌饼:①将枯萎菌饼单接到培养平面中心;②将黄萎菌饼单接到培养平面中心;③将桔、黄萎菌饼分别接到同一平面上相对应的半径中点处。每一接种方式重复两次,每个重复作三皿,于24—26℃下培养。记载方法同前。对两次重复测得的菌落直径进行两样本均值差的t检验,如差异不显著,则求其平均数计算绝对生长速度。同时,对单独接种的菌落直径与混合接种的菌落直径也进行两样本均值差的t检验,根据差异是否显著来说明两菌共同生长时有无抑制作用。

(五) 桔、黄萎菌在三种选择性培养基上生长速度的比较

分别将桔、黄萎菌饼接种到帕克培养基^[2]、酒精培养基^[3]和土壤浸出液选择性培养基^[4]平面(15毫升/皿)中心,每一种培养基重复两次,每一重复三皿,培养温度和记载方法同前,求出平均直径,计算绝对生长速度。

(六) 计算方法

1. 绝对生长速度(G)的计算^[5]

同一温度下,培养菌落直径与培养时间的关系可认为符合指数生长 $Y = ae^{bt}$ 。式中: a 是初始菌量, b 是相对速率, t 是培养时间, e 是自然数。对该式取对数,则 $\ln y = \ln a + bt$;根据实测的菌落直径 Y_i 和 t_i 就可以求得 b 。

由于试验中使用理论上大小相等的菌饼,用绝对生长速度来比较它们的瞬时速率则更符合真实情况。

$$\begin{aligned} G &= \frac{dy}{dt} \\ &= (ae^{bt})' \\ &= bae^{bt} \\ &= b \cdot y \end{aligned}$$

2. 直线生长量关于温度变化率(B)的计算

在培养时间相同的条件下,桔、黄萎菌落直径与一定范围内的培养温度(10—28℃)的关系符合函数式 $y = A + BT$ 。根据实测的 y_i (菌落直径)和 T_i (培养温度),分别求出培养72小时,96小时和120小时的桔、黄萎菌落直径随温度而变化的三个回归方程,再进行协方差分析,求出枯萎菌的 B_r 和黄萎菌的 B_v 进行比较。

二、结 果

(一) 不同培养温度下桔、黄萎菌在PDA培养基上的绝对生长速度的比较

由表1可以看出,在试验温度范围和培养时间内,枯萎菌的绝对生长速度(G_r)始终大于黄萎菌(G_v)。其绝对生长速度的比值(G_r/G_v)变化在1.57—7.18之间。

G_r/G_v 值的变化与培养温度和培养时间有关。同一培养时间内, G_r/G_v 值随试验温度的升高而增大; 在同一培养温度下, 它又随培养时间的延长而增加。常规培养温度 (22—26℃) 下, G_r/G_v 值因培养温度和时间不同波动在 3.05—5.22 之间。

表1 各种培养温度下枯、黄萎菌在PDA培养基上的绝对生长速度比

培养温度 (℃)	不同培养时间枯、黄萎菌的绝对生长速度的比值(G_r/G_v)					
	48小时	72小时	96小时	120小时	144小时	168小时
10		1.63	1.60	2.27	2.52	2.49
15	1.57	2.56	3.56	3.81	3.89	3.77
20	2.78	3.69	3.51	3.95	3.79	4.01
22	3.10	3.93	3.52	3.64	3.89	3.68
24	3.37	4.19	4.62	5.17	5.22	4.53
25	3.05	3.80	4.14	4.51	4.50	4.59
26	3.36	3.47	4.03	4.57	4.30	4.25
28	2.98	4.12	4.21	4.72	4.65	4.56
30	4.76	5.29	6.06	6.49	7.18	6.88

(二) 在培养相同的条件下, 枯、黄萎菌在PDA培养基上关于温度的直线生长速度的比较

两菌在培养时间分别固定为72、96和120小时的条件下, 其菌落直径随一定范围内的培养温度 (10—28℃) 而变化的回归方程 $y_i = A_i + B_i T$ 经协方差分析判明有着共同的回归系数 B 。黄萎菌的 $B_v = 0.6$, 枯萎菌的 $B_r = 2.4$, B_r 是 B_v 的 4 倍 (表 2)。由此可知, 无论是培养72、96还是120小时, 枯萎菌落关于温度的直线生长速度都是黄萎菌的 4 倍左右。同时, 还说明在试验的三个时间内, 枯、黄萎菌落直径关于培养温度的矫正回归线分别是两组截距的不同, 但是斜率相同的平行线 (见图 1)。

(三) 枯、黄萎菌共同生长的特点

将枯、黄萎菌单接和混接到PDA上培养72小时得到的结果表明, 混接的两菌的菌落直径与单接的两菌的菌落直径无显著差异, 其绝对生长速度相差无几 (见图 2)。

培养96—120小时, 混接的枯、黄萎菌落开始接触, 枯萎菌落逐渐包围黄萎菌落。然而, 在两菌落接触处未见抑制圈 (见照片 1)。显微镜检发现, 在两种菌落交错处, 既有枯萎菌形成的大型分生孢子, 也有黄萎菌产生的微菌核 (见照片 2)。

(四) 枯、黄萎菌在三种选择性培养基上的绝对生长速度的比较

在用作从土壤中分离鉴别枯萎菌的帕克培养基上, G_r/G_v 值随培养时间延长而增

表2 三个培养时间内枯、黄萎菌在PDA上的菌落直径与培养温度关系的矫正回归方程

菌名	培养时间 (小时)	不同温度下的菌落直径 (毫米)								Y = A + BT		B _r /B _s
		10℃	15℃	20℃	22℃	24℃	25℃	26℃	28℃	A	B	
枯萎菌	72	3.00	7.67	23.33	32.67	31.67	28.67	31.67	32.32	-26.8		2.4
	96	3.67	16.00	35.67	38.67	40.33	42.67	46.33	44.33	-17.2		
	120	7.33	23.00	46.67	44.33	47.67	56.67	58.60	54.33	-8.4		
黄萎菌	72	2.67	4.67	7.67	9.33	10.67	10.00	11.50	10.67	-4.2		0.6
	96	3.33	7.00	12.33	12.33	12.33	13.67	14.50	14.33	-1.4		
	120	4.67	9.33	14.33	13.67	13.00	16.67	16.00	15.67	-0.6		

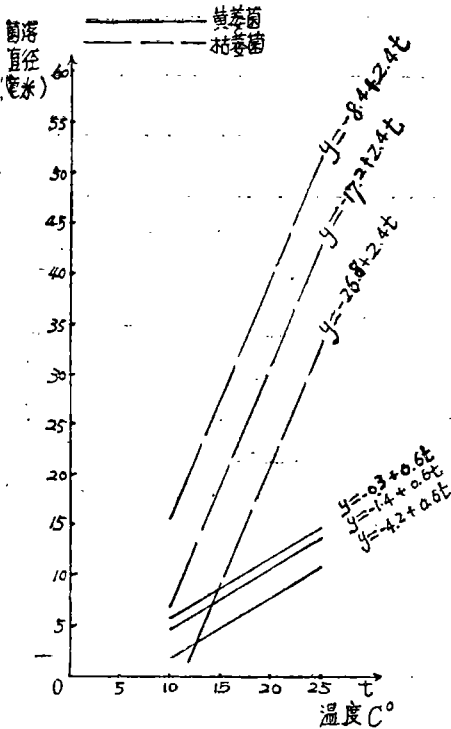


图1 三个培养时间内枯、黄萎菌在PDA上的菌落直径与培养温度关系的矫正回归线

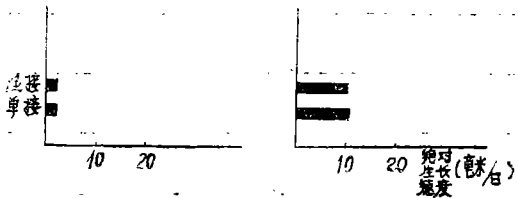
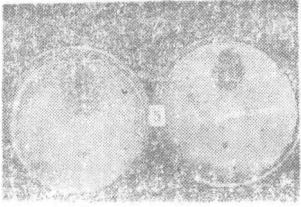


图2 在PDA上单接和混接的枯、黄萎菌绝对生长速度的比较 (24-26℃, 培养72小时)



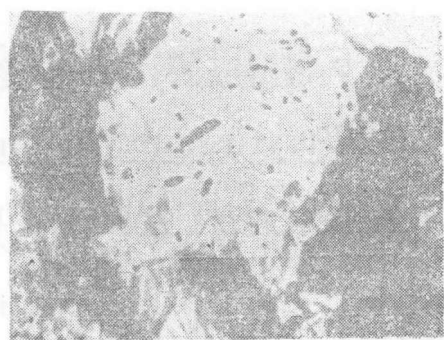
照片1. PDA培养基上共同生长的枯、黄萎菌落。照片上方是黄萎菌落, 下方是枯萎菌落; 左边是培养皿正面拍摄的照片, 右边是培养皿反面拍摄的照片。

大；而在用作从土壤中分离鉴别黄萎菌的酒精培养基和土壤浸出液选择性培养基上，其 G_r/G_v 值却因培养时间的延长而减少（表3）。可见选择性培养基可调节 G_r/G_v 值，促进特征性菌落的形成。

三、讨 论

①在常规培养温度（22—26℃）下，枯萎菌在PDA上的绝对生长速度是黄萎菌的3—5倍。这一结果与仇元在1958年的报道^[1]基本相符。

②在培养时间相同的条件下枯萎菌落在PDA上关于温度（10—28℃）的直线生长速度是黄萎菌的4倍左右。



照片2. 枯萎菌和黄萎菌在DPA上混生处形成的枯萎菌大型分生孢子和黄萎菌的微菌核。

表3 枯、黄萎菌在三种选择性培养基上的绝对生长速度比 培养温度：24-26℃

培养基	不同培养时间枯、黄萎菌的绝对生长速度的比 (G_r/G_v)						
	48	72	96	120	144	168	(小时)
帕克培养基	2.18	2.12	2.14	2.27	2.41	2.35	
酒精培养基	4.73	3.00	2.50	2.45	2.25	2.15	
土壤浸出液选择性培养基	3.93	2.69	2.57	2.41	2.22	2.27	

③同一PDA平面上生长的枯、黄萎菌之间不表现拮抗作用。然而，由于枯萎菌生长迅速，往往掩盖了黄萎菌，这可能是造成常规分离镜检混生病株时发生误检的主要原因。实际上，要在纵横交错的菌丝体丛中区别枯、黄萎菌是相当困难的。

④同一培养平面上的枯、黄萎菌可以分别形成大型分生孢子和微菌核。倘若利用选择性培养基可以调节 G_r/G_v 值的特点，限制枯萎菌的绝对生长速度，使黄萎菌也有足够的营养面积，促使两菌同时形成各自的特征性菌落，以此作为鉴别混生病株的直接依据，就可以提高鉴别混生病株的准确性。欲达此目的，就需要筛选出一种适合于这两种病原菌的选择性培养基，同时，建立一套相应的分离培养方法。

参 考 文 献

- [1] 仇元、赵丹，棉籽轮枝菌检查方法，《西北农学院学报》，1958(2)：29—40。
- [2] PorK.D、1963：Trans.Brit.Mycol.Soc.，46(3)：444—448
- [3] NadaKavuKaren、M.J.等，1959：Phytopofhology49：527—528。
- [4] 方中达，1979：《植病研究法》，125—126，农业出版社出版，1979年1月第1版。
- [5] 袁志发，1983：常微分方程在生长分析中的应用（油印本），西北农学院研究生生物数学教材。

A Preliminary Study On The Growth Characteristics Of Fusarium oxysporum f.sp.vasinfectum And Verticillium dahliae On The Sams Plate

Jin Xi-xuan

Chiu Yuen

(Northwestern College of Agriculture)

Abstract

The absolute growth velocity of Fusarium oxysporum f.sp.vasinfec-
tum (G_f) on PDA is 3-5 times as fast as that of Verticillium dahlia-
e. (G_v) under 22-26°C. The line growth velocity of F.oxysporum f.sp.
vasinfectum with regard to temperature (10-28°C) is 4 times as fast
as V. dahliae. There is no antagonism between both of the fungi, when
they are growing on the same PDA plate. F.oxysporum f.sp.vasinf-
ectum can form its macroconidia, and V.dahliae can also form its
microsclerotia. The functions of the selective media are to adjust the
rate of G_f/G_v and to promote both of the fungi to form their respec-
tive characteristic colonies simultaneously; therefore, it is possible
to identify both of the fungi on the same plate of a selective medium.