

# 棉花枯萎病致病菌定量检测的研究

李君彦 张普选 杨之为  
崔拴柱 符晓锋 朱建国

(西北农业大学植保系)

## 摘 要

选择镰刀菌用驹田或植选1号培养基,在米饭培养基上划分镰刀菌种群,用试管法或盆栽作致病性测定,以检测土壤中棉花枯萎病致病菌。试验结果表明,该致病菌主要在奶油色、淡青莲及深紫色菌群中,分别占21.2%, 11.5%, 4.5%。陕西杨陵(1985)棉枯萎病病区(发病株率85%以上),播种前10公分土层内每克干土含菌量为2236~2576个菌落。使用这一定量检测程序比单独使用选择性培养基提高了精确度,方法简便易行。

**关键词** 棉花枯萎病菌; 定量检测; 选择性培养基; 致病性试验

国内外在使用选择性培养基从土壤中分离镰刀菌方面进行了大量工作。Papavizas<sup>[1,2]</sup>提出了改订式五氯硝基苯琼脂培养基及V-8菜汁葡萄糖酵母膏琼脂(VDYA)培养基;日本测量土壤内尖孢镰刀菌低密度接种体,采用驹田氏培养基<sup>[3]</sup>,在培养基组合成分上,除考虑对目的物提高选择性,增加对杂菌的抑制性外,还注意到色素的产生以利选择识别;籍秀琴等<sup>[2]</sup>改订Nash和Snyder的五氯硝基苯琼脂培养基建立植选1号培养基,用于棉籽上常见镰刀菌种的分离鉴定工作;刘西钊<sup>[3]</sup>用Park培养基测定土壤中棉枯萎菌的含量及其分布,研究病菌的消长规律;戴丽莉等<sup>[4]</sup>研究土壤中尖孢镰刀菌的存在状态,改良Park培养基,认为用山梨糖代替半乳糖并加入五氯酚钠可抑制木霉菌及其他青霉和曲霉菌;顾本康等<sup>[6]</sup>改订日本驹田氏培养基,建立了46号培养基。

用上述各种培养基检测镰刀菌,依靠皿内菌落形态特征及颜色反应进行种的分辨实有困难。因目前已证明能引致棉花枯萎病的镰刀菌除尖孢镰刀菌萎蔫专化型(*Fusarium oxysporum* f. *Sp. vasinfectum* Snyder, et Hansen.)外,还有其它的种;尖孢镰刀菌有很多专化型,检出的尖孢镰刀菌不能直接认定为棉花枯萎病菌,因而由平板计数的精确度必然很差。改进完善土壤中棉花枯萎病致病菌定量检测的方法是本文探索研究的目的。

本文于1986年1月19日收到。

## 材料与方 法

以陕西杨陵棉枯萎病圃棉田土为检测土样,用过筛(80目)灭菌土稀释风干病圃土样,作成 $10^{-1}$ — $10^{-5}$  4个稀释度。每一稀释度重复5皿,每皿0.1克土样。风干土样计测水分含量装瓶置冰箱保存。

选择性培养基:在驹田、植选1号、Park, PSA, 土壤浸液琼脂、淀粉琼脂及山梨糖蛋白胨琼脂培养基中选出。根据病土4级稀释, 25℃暗培养3日后移入22℃下光照4天(每天12小时)培养性状,抑制土壤杂菌的能力,抗琼脂液化,选择镰刀菌及对菌落局限作用等,综合性状择优选择。

鉴别性培养基:采用拉依洛<sup>[1]</sup>研究镰刀菌属分类用的米饭培养基。在22℃培养10—15天,待菌落颜色稳定后,对土壤中选择真菌进行归类。

致病性试验:定性测定用各类群代表菌株,定量测定用单菌落培养物,在米饭管内加灭菌土种棉花直接检测,盆栽测定用的被检菌株要在麦麸稻糠固体基质上扩大繁殖后使用。测示棉种用感病鲁棉1号。棉籽经硫酸脱绒“402”热药液处理并催芽点播。根据典型症状求枯萎致病菌所占比例。

土壤相对含菌量测定:用松林土<sup>[1]</sup>对检测的病土作等级稀释处理,在温室条件种植感病品种测定土壤中病原菌的初始菌量与发病的相关性。

## 结 果

### (一)培养基综合性状

综合性状比较以驹田培养基的选择性最佳,常态培养抑制土壤杂菌能力强;植选1号在厌气条件下使用能提高选择作用,虽然还有4.55%的木霉、青霉、曲霉菌以及10%平板面积为细菌污染,但不影响对镰刀菌的选择,菌落局限性好便于计数,培养基组分容易购置。Park培养基的选择性亦好,杂菌出现率占10.9%,主要缺点是菌落局限性差,菌落重叠影响计数。PSA无抑制杂菌能力,平皿全受细菌污染,基质溶化下塌并产生恶臭气味,真菌生长呈现片状菌丛。培养基选择以驹田及植选1号符合试验要求。

### (二)土样分离法改进

采用土粒法<sup>[4]</sup>分离,先将土样均匀分散于皿底,再覆盖12℃培养基(用恒温水浴控制),使被检菌由菌丝穿过培养基形成菌落,因而平皿清晰,污染少,易作孤立菌落的挑取转移工作。常规平板涂抹表面菌落生长快,细菌污染严重。在植选1号上试验,土粒法比平板稀释涂抹选择的菌落量增大。

前人研究表明,尖孢镰刀菌及多种镰刀菌能忍受CO<sub>2</sub>的较高浓度,厌气培养能抑制杂菌提高选择效果。用棉花枯萎菌白色、紫色、F<sub>13-1</sub>菌系、茄病镰刀菌(*F. Solani*)及串珠镰刀菌(*F. mouliforme*)进行试验,厌气处理使菌落生长均受到限制。枯萎菌在植选1号上比其在自然对照PDA上菌落直径局限缩小70%。土粒法分离与植选1号厌气培养组合应用,改进了土样分离方法。

### (三)土样检测及菌群

土样检测以 $10^{-2}$ 稀释度菌落数适中, 3日暗培养后统计菌落数, 驹田及植选1号培养平均每皿分别有菌落25.8及29.0个。

米饭培养基对选择的土壤真菌, 分色鉴别效果明显。将皿内分散菌落转接于米饭管比色归类, 获得镰刀菌和相似种群的菌落颜色表现为奶油色、淡青莲、紫红、深紫、山鸡褐、古铜褐、迎春黄及凋叶棕(表1)。由驹田培养基选出的79株菌落分色出现奶油色、淡青莲及深紫色菌系分别占34.17%、17.72%及8.85%; 由植选1号基质上选出的103株菌落, 上述菌系出现率依次为29.12%、14.47%、4.85%。

表1 从病土 $10^{-2}$ 稀释度中分离出的各类菌群

选择性培养基	分离日期	总菌落数	米饭管数	各类菌在米饭培养基上颜色								
				白色	奶油	淡青莲	深紫	紫红	山鸡褐	古铜褐	迎春黄	凋叶棕
驹田	3.18	30	25	0	6	5	6	4	2	0	0	2
	3.27	16	15	0	7	2	0	1	1	3	0	1
	4.13	13	12	0	3	3	0	0	0	6	0	0
	4.15	44	27	0	11	4	1	0	5	0	0	6
	$\Sigma$	103	79	0	27	14	7	5	8	9	0	9
	$\bar{X}$	25.75	19.75	0	6.75	3.50	1.75	1.25	2.00	2.25	0	2.25
植选一号	3.18	30	30	5	6	9	1	0	5	0	2	2
	3.27	34	22	0	8	6	2	0	2	0	0	4
	4.13	34	33	1	10	3	0	0	0	16	0	3
	4.15	18	18	1	6	0	2	0	6	0	0	3
	$\Sigma$	116	103	7	30	18	5	0	13	16	2	12
	$\bar{X}$	29.0	25.75	1.75	7.50	4.50	1.25	0	3.25	4.00	0.50	3.00

注: 采样日期1985, 3, 14; 病圃土, 每次分离5个重复。

凋叶棕、迎春黄为不产孢菌群, 用麦粒培养诱发有性子实体未获成功。山鸡褐类群主要为木贼镰刀菌(*F. equiseti*)。白色致密菌系菌丝无隔, 以及少数黑色、灰色及绿色菌株系非镰刀菌种。

#### (四) 致病性试验

定性测定9个分离菌群, 两次接菌量分别为盆土重的1.2%和5%。试验结果表明, 棉枯萎病致病菌存在于奶油色、淡青莲、紫红及深紫菌群中。5%接菌量古铜褐菌群于棉株5叶期出现了1株病株。

用试管法定量检测病土中各色镰刀菌群的致萎性, 7群共324管菌株中有4个类型

共15管菌株发病。奶油、淡青莲、粉红及深紫菌群中棉枯萎致病菌分别占10.2%、11.5%、4.3%及2.9%。用盆栽重复检测4个菌群包括对照组共136管,奶油色、深紫菌株中致病菌占21.2%及4.5%。参试其他菌群凋叶棕、山鸡褐、古铜褐、紫红等不能致病。

### (五) 相对定量值计算

根据实验数据,以致病性稳定菌群的高限致病率,用下列二式可分别求出驹田及植选1号基质选择分离的棉枯萎致病菌的土壤含菌量。

$$F_v(f.) = \sum_{i=1}^n (N \cdot C_i \cdot C'_i) \quad (1)$$

$$N = \frac{a \times b}{d} \quad (2)$$

式中  $F_v(f.)$ ——棉枯萎致病菌菌落数(干土/克);

$N$ ——每克干土真菌菌落数,驹田26609.48,植选29967.96;

$a$ ——每皿菌落数(0.1克土样),驹田25.75,植选29.0;

$b$ ——土样稀释倍数 $10^{-2}$ ;

$d$ ——干土%(土样含水量3.23%);

$C_1 \cdot C'_1$ ——奶油色菌群中致病菌比例(%);

驹田 $34.17\% \times 21.2\%$

植选 $25.86\% \times 21.2\%$

$C_2 \cdot C'_2$ ——淡青莲菌群中致病菌比例(%);

驹田 $17.72\% \times 11.5\%$

植选 $15.51\% \times 11.5\%$

$C_3 \cdot C'_3$ ——深紫菌群中致病菌(%);

驹田 $8.85\% \times 4.5\%$

植选 $4.31\% \times 4.5\%$ 。

计算结果:用驹田培养基选择分离得到的棉枯萎病致病菌每克干土含菌量2575.82个菌落,植选1号培养基分离出2235.58个菌落,相对定量值二者相差340个。

### (六) 棉枯萎病土壤初始菌量与发病关系

播种前期(3月20日),从病圃取土样用松林土作稀释处理。在温室条件种植感病品种鲁棉1号。从发病始日起每3日记载1次病情。试验结果(表2)表明,在变温正常发病条件下,土壤中棉枯萎菌的初始菌量与发病的关系为未稀释病土,每克干土含菌量相当于 $2.5 \times 10^3$ 水平时,发病期短,出苗至显症22天,病势发展较快。当病土作 $10^{-1}$ 稀释时,发病期延迟6~7天,出苗至发病需要28~29天。病土稀释至 $10^{-2}$ 时,发病期推迟12~13天,从出苗至发病经约34~35天,病势发展缓慢。当病土稀释至 $10^{-3}$ 及 $10^{-4}$ 级浓度,相当于有接种体含菌量在2.5个水准下,则不再表现症状。据此推论,棉枯萎病发生是土壤中枯萎菌群体作用的结果,当菌量减少到一定限量时便失去群体致病效应,土壤含菌量是病害消长制约因素之一。根据发病期的长短及病势速率发展快慢可指示估测土壤中的初始菌量相对值。

表2 棉枯萎病菌土壤初始菌量与发病的关系

调查日期 (1985)		4.26	4.29	5.2	5.5	5.8	5.11	5.14	5.17	5.20	5.23	5.26	5.29
寄主生育期		子叶展平	1片真叶			2片真叶			3片真叶			4片真叶	
三日均温(°C)		17.4	20.1	25.1	19.5	18.5	22.3	21.9	16.4	19.5	22.8	23.0	20.2
病土	发病率%	7.5	20	28.3	37	59.6	75.5	79.2	81.1				
	病指	2.5	10	17.5	27.7	39.9	56.6	60.4	65.1				
10 <sup>-1</sup>	发病率%			11.0	22.4	38.6	47.5	52.6	53.3	58	66.7		
	病指			4.5	11.6	20.6	36.0	38.2	45	46.9	55.7		
10 <sup>-2</sup>	发病率%					4.2	6	7.8	8	10	16.7	18	26.5
	病指					2.1	3.5	4.4	5.5	5.5	10.4	10.5	15.2

注：病土10<sup>-3</sup>，10<sup>-4</sup>稀释度及灭菌土对照不发病。

## 讨 论

1. 用驹田或植选1号培养基，后者厌气培养能抑制土壤中多种杂菌的生长，对镰刀菌有较好选择作用。经3日暗培养并4日光照处理形成的菌落，不能直接分辨出棉花枯萎菌。呈现紫色素的菌落并不一定就是枯萎病菌。光照产孢显色为不必要环节，暗培养后可直接将选择的菌株转入米饭培养管。

2. 用米饭培养基于土壤中常见镰刀菌种分色归类是适用的。拉依洛<sup>[1]</sup>指出，尖孢镰刀菌包括棉枯萎病菌其菌落色级在白色、红色及紫色范围内是正确的，但在这样色级内还存有尖孢镰刀菌以外的其他镰刀菌种，在米饭基质上比色后仍不能鉴定出棉枯萎致病菌。致病试验明确了在奶油色、淡青莲及深紫菌群中棉枯萎致病菌仅占一定比例。检测棉枯萎致病菌在无准确简便手段之前，重视致病性生物测定关键环节尤为重要，缺少这一步骤，若单纯按菌群色级来推断棉枯萎菌的存在，必然作出错误的结论。

3. 综合前人研究成果并通过试验而建立的棉枯萎病菌检测程序，是土壤带菌定量检测比较实用的方法。不作菌种形态镜检，克服了工作难度并减少了工作量。检测精度比单独使用选择性培养基高。陕西杨陵病圃棉枯萎菌含菌量2236~2576个菌落(干土/克)，低于有关报告而更接近实际；这样的菌量水平已能满足抗萎品种鉴定选择的需要。

4. 病土作等级稀释，用感病品种测定，其结果发病期随稀释度加大而有规律的推迟，病情有规律的下降。说明土壤中的初始菌量是影响病情轻重的重要因素。依试验数据作出病情曲线对指示大田病土中棉枯萎菌的相对含量有实际参考价值。

5. 通常认为棉枯萎病菌为土壤习居菌，但其在土壤残体中的定殖存活率远比离体存活于土壤中高。McMullen(1983)报告，从土壤中分离 *Fusarium* spp. 用 Martin 培养基碎片技术的获得率最高。因此，从病残体中检测病菌与本试验结果比较是必要的工作。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 拉依洛 A. U. 著, 王云章等译: 《镰刀菌》, 科学出版社, 1958。
- [ 2 ] 籍秀琴、何礼远等: 棉籽带枯萎病菌检验方法的研究, 《植物保护学报》, 7 ( 3 ) 1980: 171—176。
- [ 3 ] 刘西钊、苏菊英等: 土壤中棉枯萎病菌的消长规律及分布的研究, 《棉病资料》, ( 142 ) 1981: 19—28。
- [ 4 ] 戴丽莉等: 尖镰孢萎蔫专化型在土壤中的存在状态和菌量消长的关系, 《土壤学报》, 18 ( 4 ) 1981: 368—375。
- [ 5 ] 郝文英等: 尖孢镰刀菌在土壤中的竞争腐生定殖与腐生存活, 《土壤学报》, 21 ( 3 ) 1984: 284—290。
- [ 6 ] 顾本康、李径仪: 利用选择性培养基探测棉田棉花枯萎病病原菌的菌量与发病关系, 《全国第一届土传病害会议论文集》, 1984。
- [ 7 ] 驹田 且: *Fusarium Oxysporum* 的选择性分离培养基及其利用, 《植物防疫》, 29 ( 4 ) 1975: 125—130。
- [ 8 ] Johnson, L. F., and Manka, K.: A modification of Warcup's Soil-plate method for isolating Soil fungi, *Soil Sci.*, 92, 1961: 79—84。
- [ 9 ] Domsch, k. H., and Gams, W.: *Compendium of Soil fungi*, V. 1, Academic pr., 1980: 323—328。
- [ 10 ] Papavizas, G. C.: Evaluation of various media and antimicrobial agents for isolation of *Fusarium* from soil, *Phytopathology*, 57, 1967: 448—852。
- [ 11 ] McMullen, M. P., and Stack, R. W.: Effects of isolation techniques and media on the differential isolation of *Fusarium* Species, *Phytopathology*, 73(3) 1983: 458—462。
- [ 12 ] Toussoun, T. A., Menzinger, W., and Smith, Jr. R. S.: Role of Conifer Litter in Ecology of *Fusarium*: Slimulation of Germination in Soil, *Phytopathology*, (59) 1969: 1396—1399。

STUDIES OF THE QUANTITATIVE TEST OF *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfectum* Snyder et Hans. IN SOIL

Li Junyan      Zhang Puxuan      Yang Zhiwei

Cui Shuanzhu      Fu Xianfeng      Zhu Jianguo

(Department of Plant Protection, Northwestern Agricultural University)

Abstract

Rice medium was used to identify the species groups of genus of *Fusarium* fungi selected by Komada or No.1 selective culture medium from soil. The glass tube or the pot cultivation method was also used to determine the pathogenicity of pathogens so as to detect *Fusarium* wilt of cotton in soil. Experimental results indicated that *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* mainly occurred among the cream, light purple and dark purple species groups at the rate of 21.2%, 11.5% and 4.5% respectively, and that before sowing in the upper 10 cm of soil layer there might be 2236-2576 colonies of pathogens per gram of dry soil in the cotton wilt disease nursery (more than 85% of wilted plants) in Yangling area, Shaanxi. The detective precision by using this quantitative detective procedure was much more improved than by solely using the selective culture medium. Also, this method is simple and practical.

**Key Words** *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*,  
quantitative detection; Selective culture medium; test of  
pathogenicity