

一种简便分离土壤棉花黄萎病菌的选择性培养基

贾涛, 杨家荣*

(西北农林科技大学植保学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:介绍了一种用于检测土壤棉花黄萎病菌的选择性培养基,其成分为:鲜棉叶 100 g,蔗糖 5 g,琼脂 17~20 g,40%PCNB 0.3 g,氯霉素、链霉素和青霉素各 0.05 g,水 1000 ml,pH6.4~7.0。该培养基与其它常见分离培养基相比,成分简单、操作简便,检测率显著,抑菌效果好,病菌在其上生长快、菌落典型,是一种较为理想的选择性分离培养基。

关键词:土壤;棉花;黄萎病菌;选择性培养基;检测

中图分类号:S435.621 **文献标识码:**A

文章编号:1002-7807(2005)03-0151-04

A New Selective Medium to Simplify Isolate *Verticillium dahliae* in Cotton from Naturally Infested Soil

JIA Tao, YANG Jia-rong*

(College of plant protection, Northwest A. & F. University, Shanxi, Yangling 712100, China)

Abstract: A new selective medium to simplify isolate *Verticillium dahliae* in cotton from naturally infested soil was introduced. The medium consisted of following ingredients per liter distilled water: cotton leaves 100 g, sugar 5 g, agar 17~20 g, 40% PCNB 0.3 g, chloramphenicol 0.05 g, streptomycin 0.05 g and penicillin 0.05 g, pH adjusted to 6.4~7.0. The medium was simple and quick. The microsclerotia *V. dahliae* from naturally infested soil could be effectively isolated while it was rarely infected by other pathogens. The colonies of *V. dahliae* on the medium were large black-colored, and the mean recovery rate of the number of *V. dahliae* inoculated in soil could reach 82.88%. In addition, the microsclerotia *Verticillium dahliae* growth speed on this medium was the fastest. At the same time, the optimum determining duration was 21st days after microsclerotia *V. dahliae* from naturally infested soil were cultured on this medium. Alteration amount of leaves cotton quality in 1000 ml medium had great effect on isolating. When it was low than 0.05 g · ml⁻¹ medium, the medium was rarely infested by other pathogens, but the rate of the number of the microsclerotia *V. dahliae* from naturally infested soil was lower, because there was insufficient nutrition. When it was high than 0.125 g · ml⁻¹ medium, although nutrition was adequate for microsclerotia development and the growth speed of *V. dahliae* on it was faster, the medium was seriously infested by other pathogens and it was gradually changed no transparence, so the rate of the number of the microsclerotia *V. dahliae* was lower, too.

Key words: soil; cotton; *Verticillium dahliae*; selective medium; isolating

棉花黄萎病是一种世界性土传维管束萎蔫病害,近年来在我国主产棉区持续暴发危害,造成严重损失。国内外的研究证实,棉花黄萎病的发生发

展及危害损失与土壤中病原菌的初侵染源和繁殖体——微菌核有极为密切的关系。因此,明确棉黄萎病菌在土壤中的分布、消长、侵入等基本情况,对

抗病育种工作及病害的预测和防治有重要意义。目前,关于分离土壤棉黄萎病菌的选择性培养基,国内外已有一些报道^[1-6],但是这些培养基是不同的人在不同的地区,为适应不同的土壤结构及土壤微生态环境而研制的,成分普遍较为复杂,具有较强的特异性,因此分离效果往往不太理想,在使用前,必须对其成分及用量进行适当调整,以适应各自试验所选土壤微生态系。为此,2003—2004年,作者在前人选择性培养基的基础上,鉴定筛选出了一种简便、易操作的分离土壤棉黄萎病菌的培养基,目的在于为科研和生产提供检测方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

西北农林科技大学农学院棉花所斗口试验站棉花黄萎病圃土壤和杨凌植保学院棉病圃中的健康棉花新鲜叶子作为供试材料。

试验培养基的选择:改良 MSEA 培养基(土壤浸提液培养基)、棉选一号培养基、吕金殿 PDA 改良培养基。自制培养基:鲜棉叶 100 g,蔗糖 5 g,琼脂 17~20 g,40%的 PCNB 0.3 g,氯霉素、链霉素、青霉素各 0.05 g,H₂O 1000 ml,pH 值 6.4~7.0。

1.2 试验方 法

1.2.1 土样制备。在西北农林科技大学农学院棉花所斗口试验站棉花黄萎病圃用取土器在 0~20 cm 的耕作层内随机多点取样。土样混合后在室内自然风干 1 周,并用制样粉碎机粉碎,过筛(筛孔直径 2 mm),然后装入塑料袋保存在 4~5℃ 恒温箱中待用。

1.2.2 检测方法。采用水筛法^[1]。称取 5 g 土样溶于装有 200 ml 水的三角瓶中,静置 20 min 后,充分摇动 5 min,并在自来水下用 200~38 μm 筛网过筛土样液,并将留在 38 μm 筛网上的土壤残留物全部转移到小三角瓶中,用蒸馏水定容为 40 ml。4 种培养基各接 5 皿,每皿用开口液移管分别移取 2

ml 展布于培养基表面(每皿相对接种量为 0.25 g),置超净工作台上自然风干,在 25℃ 下培养 3 周,取出培养皿后,在自来水下用毛刷轻轻刷掉培养基表面的土粒,借助光源在双目解剖镜下,统计培养基上棉花黄萎病菌微菌核萌发形成的菌落数。

1.3 土壤棉花黄萎病菌培养时间和检测回收率测定

1.3.1 土壤棉花黄萎病菌培养时间。土样制备及检测方法同上。在第 7 天、10 天、14 天、21 天、28 天分别观察记载病菌在各培养基上的生长菌落数(黑色放射状),求出每种培养基在各观察时期 5 皿的平均值。

1.3.2 土壤棉花黄萎病菌接种体回收率测定。将棉花黄萎病的分离菌株接种在 PDA 平板培养基上,置 25℃ 培养,待长出菌落大量产生微菌后,把培养菌放入研钵中,加适量蒸馏水轻轻研磨。在解剖镜下观察到研磨菌样中微菌核与琼脂以及微菌核彼此间分开时,用粘贴有硬毛发的接种环在解剖镜下分别挑起微菌核 15、30、45、60、75 个,分别放入置有 200 ml 水的三角瓶中,称取 5 g 风干灭菌土分别放入上述 5 个三角瓶中,每个浓度重复 3 次,以清水土壤接种为对照。采用水筛法,利用自制培养基测定土壤接种体回收率。

1.4 影响自制培养基检测效果的因素

土样制备及检测方法同 1.2。

2 结果与分析

2.1 自制培养基检测效果

采用土壤水筛法比较 4 种培养基对棉田土壤棉花黄萎病菌的检测结果表明,自制培养基的检测效果和抑菌情况与改良 MSEA 培养基基本相当,但其成分简单,操作简便,不受人为因素与土壤成分、结构等影响,可随处取材。同另外 2 种培养基相比,自制培养基据有显著的检测率和抑菌效果。因此,笔者认为棉花叶 PCNB 培养基是分离土壤黄萎病菌较为理想的培养基之一(表 1)。

表 1 自制培养基与几种常用培养基检测土壤棉黄萎病菌菌核效果比较

Table 1 The detection efficiency of *V. dahliae* in naturally infested soil by using four media

培养基名称	平均每皿/个	每克土壤菌核/个	杂菌情况
自制培养基	7.2	28.8	+
土壤浸提液培养基	6.4	25.6	+
棉选一号培养基	3.2	12.8	+++
吕金殿 PDA 培养基	2.8	11.2	++++

注:“+”反映杂菌污染情况;“+”越多,表示杂菌污染越严重,反之越轻。

2.2 棉花黄萎病菌在自制培养基上的培养时间

采用水筛选法比较 4 种培养基检测土壤棉花黄萎病菌菌核萌发快慢的试验结果表明,随着培养天数的增多,每克土壤中检出微菌核的数目在不断增加,但在自制培养基上,微菌核的萌发速度显然较快。从表 2 可知,在第 7 天,在自制培养基

上每克土壤上有 3.2 个菌核萌发,在吕金殿等 PDA 上有 2.4 个,在其余 2 种培养基上还没有萌发菌核。在第 10 天,MSEA 培养基上仍没有,而在自制培养基上已有 12.8 个微菌核萌发,在第 14 天、21 天仍以它为高。到了第 28 天培养基变干,因此,自制培养基以培养 21 天为宜。

表 2 棉花黄萎病菌在自制培养基上的培养时间

Table 2 Number of days on *V. dahliae* development on cotton leaves extract agar media 个·g⁻¹

培养天数	自制培养基	MSEA	棉选一号	吕金殿等 PDA
7	3.2	无	无	2.4
10	12.8	无	3.6	3.8
14	22.6	4.8	7.4	8.4
21	24.0	19.2	16.6	14.2
28	变干	21.4	变干	变干

2.3 自制培养基的检测回收率

自制培养基对土样接棉花黄萎病菌检测回收率测定结果表明(表 3),该培养基具有较高的检

测回收率,平均回收率为 82.88%,这说明该培养基营养成分合理,适合分离土壤棉花黄萎病菌。

表 3 自制培养基对土壤黄萎病菌接种体检测回收率的测定

Table 3 Determining the recovery rate of the number of *V. dahliae* inoculated in soil by cotton leaves extract agar media

5 g 土壤微菌核接种/个	5 g 土壤 中检出微菌核/个	回收率/%
0(CK)	0	0.0
15	13	86.7
30	25	83.3
45	36	80.0
60	49	81.7
75	62	82.7

注:表中数据为三次重复平均值。

2.4 影响自制培养基检测效果的主要因素

自制培养基的主要成分是鲜嫩棉叶,它的含量的变化对检测效果影响较大。由实验结果(表 4)可知,鲜嫩棉叶的含量不宜过低,也不宜过大。每毫升培养基含有棉叶的量低于 0.05 g,虽然杂菌污染少,但因营养成分不够,菌核萌发生长受阻,检测效果不高。每毫升培养基含有棉叶的量高于 0.125 g 时,养分虽然增加,菌核萌发加快,但杂菌污染变得严重。同时,由于培养基中叶绿

素含量增多,培养基颜色逐渐加深,透明度下降。因此,镜检观察受阻,一部分萌发菌核不易观察到,检测效果反而降低。

另外,需要特别指出的是,pH 值也是一个需要注意的事项。这种棉叶蔗糖培养基在灭菌前,pH 值一般在 8~9 间,不利于黄萎病菌生长,因此,必须对其 pH 值加以调节,使其保持在 6.4~7.0 之间,有利于黄萎病菌生长。

表 4 影响自制培养基检测效果的主要因素

Table 4 The effect of alteration amount of chief ingredients on isolating

每毫升培养基所含棉叶的量/g	平均每皿/个	每克土壤菌核数/个	杂菌情况	培养基颜色
0.025	3.6	14.4	+	淡褐色,透明
0.050	5.4	21.6	+	淡褐色,透明
0.075	6.8	27.2	+	淡褐色,透明
0.100	7.0	28.0	+	浅褐色,透明
0.125	6.0	24.0	++	褐色,半透明
0.150	5.6	22.4	+++	深褐色,几乎不透明

注:“+”反映杂菌污染情况;“+”越多,表示杂菌污染越严重,反之越轻。

3 讨论

经过对四种培养基检测率、培养时间、检测回收率等几方面的对比试验,结果表明该自制培养基检测率高,可达 82.88%,抑菌效果好,成分简单,操作简便,不需昂贵的药品与先进仪器,是一种值得推广的选择性分离培养基。以往的土壤棉黄萎病菌分离培养基^[2-6]是不同的人根据不同地区、不同土壤结构及其棉花黄萎病菌生理型制定的,成分复杂,适合多种微生物生长,分离效果不是很理想。本实验除保留了前人培养基中常用的抑制剂 PCNB 及一些抗菌素外,其余营养成分均用棉叶浸提液代替,不需再添加任何营养物质。棉花是黄萎病菌最适宜的寄主之一,其叶子浸提液中含有病菌生长发育所需的一切营养物质,所以在该培养基上黄萎病菌菌核萌发快。根据实验结果推测,棉花及其组织器官浸提液中,可能含有某些能够吸引和刺激黄萎病菌微菌核萌发与生长的物质,而棉花黄萎病菌微菌核中也许含有某种能够识别适宜寄主中的某些化合物的物质。这些

刺激物或识别物是否存在有待深入探讨。

参考文献:

- [1] 杨家荣, 商鸿生. 分离土壤棉花黄萎病菌选择性培养基的筛选[J]. 植物病理学报, 2002, 32(3): 236-240.
- [2] 吕金殿, 杨家荣, 吉冉中. 土壤棉花黄萎病菌分离方法研究[J]. 植物病理学报, 1989, 19(1): 52.
- [3] 籍秀琴, 朱颖初. 土壤棉黄萎病菌选择性培养基棉选一号[J]. 植物病理学报, 1988, 18(3): 187-190.
- [4] HARRIS D C, Yang J R, Ridout M S. The detection and estimation of *Verticillium dahliae* in naturally infested soil[J]. Plant Pathology, 1993, 42: 238-250.
- [5] 夏正俊, 顾本康, 李经仪, 等. 土壤中棉花黄萎病菌分离法之一[J]. 江苏农业学报, 1991, 7(3): 50-51.
- [6] HUISMAN O C, Ashworth L J. Quantitative assessment of *Verticillium albo-atrum* in field soils; Procedural and substrate improvements[J]. Phytopathology, 1974, 64: 1043-1044. ●