

尖镰孢萎蔫专化型在土壤中的存在 状态与菌量消长的关系

戴丽莉 顾希贤 林先贵 郝文英

(中国科学院南京土壤研究所)

尖镰孢萎蔫专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*) 是一种寄生兼腐生的土传性植物病原真菌,这种真菌除引起棉花枯萎病,严重危害棉花生产外,还能侵染大豆、烟草、花椰菜等 40 多种作物¹⁾,以及多种杂草⁶⁾。因此,该种真菌既能在受侵染的棉花植株体内繁殖蔓延,也能在其它宿主体内存活,并随同作物残体进入土壤中以腐生方式生活,或以厚垣孢子等休眠结构维持其生命。停种寄主作物后,该种真菌可在土壤中存活十多年²⁾,甚至可在某些土壤中无限期地存留下去⁶⁾。鉴于这类真菌在土壤中可以以多种途径生存,在防治上造成困难。国内有些地区采用稻棉轮作的办法来防治棉花枯萎病,取得一定效果,但却不能彻底根除。本文着重报道该菌在土壤中形成厚垣孢子的条件,厚垣孢子的萌发和存活及其与菌量消长的关系,进一步探讨了渍水对该菌在土壤中存活的影响。

一、材料和方法

菌种是从江苏省盐城地区新洋试验站棉花枯萎病重病田中分离而得,并经过植株回接试验验证。编号为 37 号。

本试验所用土壤有:江苏盐城地区试验站滨海盐土(最大持水量为 55%);江苏南通三余棉场滨海盐土(最大持水量为 55.5%);江苏江浦棉场马肝土(最大持水量为 55%)。

(一) 厚垣孢子制备: 1. 玻璃纸培养法——将约 1×1 厘米大小的玻璃纸灭菌后贴在混有尖镰孢萎蔫专化型孢子的马铃薯蔗糖琼脂表面,于 25℃ 培养约 4 天,待菌丝布满玻璃纸表面后,部分置冰箱待用,部分继续贴在加水至饱和、表面光滑的土面上,保温培养 4—7 天,待形成的厚垣孢子多数成熟脱落后,置冰箱待用。 2. 土壤接种法——参考 Nash, S. M. 等³⁾的方法,用三余棉场新鲜病土与尖镰孢萎蔫专化型的孢子、菌丝碎片混匀、干湿二次,待繁殖体转为厚垣孢子后,用吖啶橙荧光染色、镜检,并在修改的 Park 氏⁴⁾琼脂平板上测原始菌量。

(二) 温度和水份试验: 1. 将上述二种玻璃纸材料分别放在加水至饱和、表面光滑的土面上,并埋入不同含水量的土壤中,于不同温度下保湿培养,定期取样镜检,分别计数各

1) 中国农业科学院棉花研究所情报资料室、植保研究组, 1977: 国外棉花黄、枯萎病研究动态(1973—1976), 全国棉花枯黄萎病综合防治研究资料选编(1975—1976), 131—148 页。

2) 修改 Park 氏培养基配方为: NaNO₃, 2 克, 山梨糖 10 克, MgSO₄·7H₂O 0.5 克, KH₂PO₄, 1 克, K₂S₂O₈, 0.3 克, 五氯酚钠 1 毫克, 洋菜 20 克, 蒸馏水 1 公升。

处理中厚垣孢子形成、萌发的数量。2. 将含厚垣孢子的土分别加水至最大持水量的 20%、40%、60% 及水层高为 1 厘米的渍水土壤, 用塑料纸封口并定期补水保湿, 28℃ 下培养, 定时随机取样, 用修改的 Park 培养基以稀释平板法计数。

(三) 氧分压试验: 将上述二种玻璃纸培养的材料分别埋入含水量为 20% 的土壤中并贴在土表; 将含厚垣孢子的土加水至最大持水量的 60%, 分别置于密封的干燥器内, 抽真空, 分别充氮气(用焦性没食子酸吸去少量的氧)、二氧化碳气(内含 80—90% 二氧化碳、2—5% 氧气), 同时设未去氧处理为对照, 并设一淹水(保持水层高 1 厘米)处理, 28—30℃ 培养, 不同时间取样观察厚垣孢子的形成、萌发和存活。

二、结果和讨论

(一) 厚垣孢子的形成

用玻璃纸培养法在江苏盐城地区新洋试验站砂壤土(棉花枯萎病重病田土壤)及其它肥沃菜园土上试验的结果表明: 土壤中尖镰孢萎蔫专化型的菌丝体内或菌丝顶端在适宜的温度条件下, 很容易产生厚垣孢子(表 1)。

表 1 不同温度下尖镰孢萎蔫专化型厚垣孢子的形成(厚垣孢子数/视野)

Table 1 Formation of chlamydo spores of *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* under different temperature (number of chlamydo spores/each field)

温度(℃) Temperature	培 养 天 数 Incubation time (Days)						
	1	2	3	4	5	8	11
15	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0.1	3.0	8.0	9.2	13.5
25	0	0.2	0.6	1.0	3.0	15.0	14.9
30	0	0	0.3	1.3	2.5	15.0	13.0
35	0	0	0	0	0.5	5.8	17.9

从表 1 可以看出, 在 15℃ 下未见厚垣孢子形成, 35℃ 下形成缓慢, 第 5 天才形成个别厚垣孢子, 而在 20—30℃ 下培养 3 天左右, 菌丝体内即开始形成厚垣孢子。看来适合该菌厚垣孢子形成的条件与棉枯病发病条件一致。说明随着当年感病脱落的棉花残体进入土壤的菌体可以很快产生大量厚垣孢子, 并因此得以在土壤中休眠存活。

土壤含水量不同对厚垣孢子形成也有明显的影响, 尖镰孢萎蔫专化型的菌丝体在一般旱作土壤(土壤含水量约 20% 左右)中, 3—6 天即已开始形成厚垣孢子, 而且新菌丝生长茂盛, 并同时产生大量分生孢子, 分生孢子和厚垣孢子成熟后萌发产生的菌丝体, 又都能产生新的厚垣孢子, 由此, 繁殖体数量也随之增加。但是, 在渍水条件下的土壤中, 尖镰孢萎蔫专化型只产生极个别的厚垣孢子, 而渍水 3—4 天后, 菌丝体周围细菌密集, 多处被细菌溶解而断损, 大约 10 天后只能见到菌丝碎片和极个别的厚垣孢子, 芽管菌丝未能继续生长, 也未见能再形成分生孢子。

(二) 厚垣孢子的萌发

关于镰刀菌属厚垣孢子萌发的条件说法不一, Tousson 和 Snyder^[5]认为,厚垣孢子在纯水中容易萌发,但是在土壤中即使是在渍水条件下也难以萌发,他们用茄病镰刀菌菜豆专化型 (*F. solani* f. *phaseoli*) 试验的结果指出,厚垣孢子只有处于类似于该病菌侵染寄主的条件下时才萌发,或者在贴近发芽的寄主植物种子和根尖时才萌发。我们用玻璃纸培养法在不同的温度和水份条件下进行了尖镰孢萎蔫专化型厚垣孢子萌发试验(图 1)。

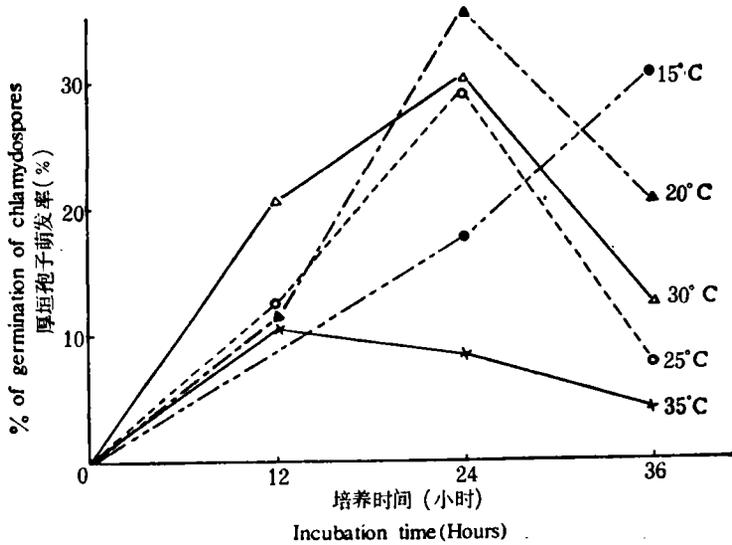


图 1 不同温度下尖镰孢萎蔫专化型厚垣孢子的萌发

Fig 1. Germination of chlamydozoospores of *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* under different temperature

表 2 尖镰孢萎蔫专化型的厚垣孢子在土壤中的萌发率 (%)

Table 2 Chlamydozoospore germination of *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in soil

培养时间 (小时) Incubation time (hours)	4	8	12	16	20	24	36	48	72
旱作土壤 Under dry farming	34.3	—	39.6	31.4	35.2	42.5	28.9	40.0	34.3
渍水条件下的土壤 Under water-logging	23.1*	28.4	30.3	34.0	30.2	15.7*	19.2**	19.8**	8.8**

注: * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$ 。

看来,在旱作土壤条件下,除 35°C 培养时厚垣孢子发芽率较低外,20—30°C 皆适合厚垣孢子发芽,说明适合厚垣孢子形成的温度也同样适宜厚垣孢子发芽,当土壤内有适当的基质存在时,该菌厚垣孢子可以反复地形成和萌发,从而使土内菌量不断增加。

土壤水份状况对厚垣孢子发芽也有影响,试验表明在有足够水份的情况下厚垣孢子虽都能萌发,但其萌发率在旱作土壤中者略高,尤其是 24 小时后较为明显(表 2),而且萌发产生的芽管菌丝可以继续发育再产生分生孢子和形成新的厚垣孢子。这些厚垣孢子

又可再萌发、繁殖。而在渍水条件下的土壤中,部分萌发的厚垣孢子由于产生的芽管及菌丝不久即被细菌分解。8—9 天后发芽的厚垣孢子也被分解,因而菌量不断下降。看来,渍水条件下的土壤不仅不利于厚垣孢子的形成,而且原有的厚垣孢子萌发后也难以存活,由此导致的菌量减少,对暂时控制病害的发展有一定作用。

(三) 厚垣孢子的存活

在上述试验中观察到,无论在渍水条件下的土壤或通气良好的旱作条件下,土壤中都有相当数量的厚垣孢子可以萌发。为了解这些厚垣孢子在土壤中的命运及其存活状况,我们将接种厚垣孢子的土壤培育于不同水分条件下,然后定期检测其存活的数量(图 2)。

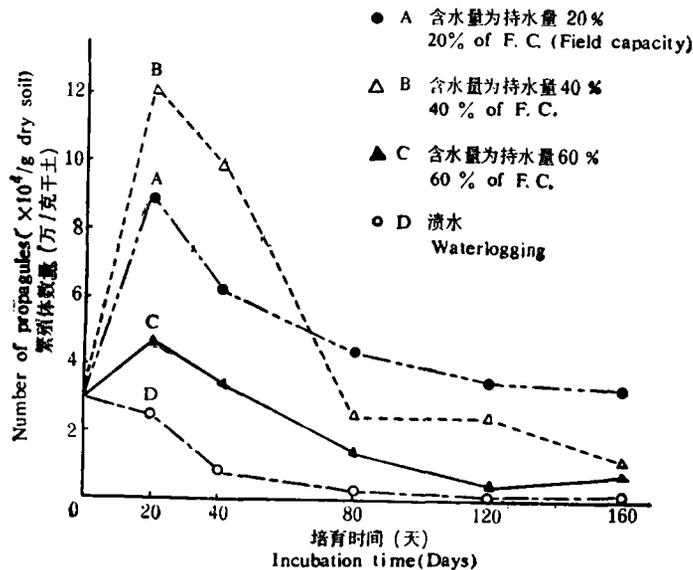


图 2 不同水份状况下土壤中厚垣孢子的存活

Fig 2. Survival of chlamydospore of *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in soil under different water regime

试验结果表明,在不同含水量的土壤中,培养 20 天后菌量均逐渐下降,从培养 160 天时分析的结果来看,土壤含水量为最大持水量 20%、40%、60% 及渍水的土壤中,菌数分别相当于起始菌数的 108%、37%、30% 及 2%。这说明土壤水份状况对该菌的繁殖和存活有直接的影响,渍水条件下的土壤对该菌的繁殖和存活是很不利的。

Newcombe^[4] 和 Stover^[7-9] 等人以尖镰孢香蕉专化型 (*F. oxysporum* f. *cubense*) 为试验材料,研究土壤渍水对该菌存活的影响时,都曾指出渍水大大减弱了该菌在土壤中的存活。但是,他们对结果的解释却不一致。前者把这种现象归因于在渍水条件下土壤中 CO₂ 抑制了厚垣孢子的形成,从而妨碍了它们在土壤中的生存;而后者则认为是由于渍水土壤中缺氧所致。

为进一步探讨渍水条件下的土壤不利于该菌存活的原因,我们将从江苏、山东、湖北、云南、新疆等地收集的不同菌株的菌丝体埋在含水量为 25% 的土壤中(盐城地区试验站

滨海盐土),分别置于有氧和无氧条件下培养,以观察厚垣孢子的形成,并与渍水条件下土壤中者比较,结果如表 3 所示。

表 3 有氧、无氧及渍水条件下的土壤中厚垣孢子的形成
Table 3 Formation of the chlamydospores of *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in soil under aerobic, anaerobic and water-logged soil conditions

菌 号 Strains	土 壤 含 水 量 25% 25% of soil water content						土 壤 渍 水 Water-logging		
	有 氧 aerobic			无 氧 anaerobic					
	培 养 时 间 (天) incubation time (Days)								
	9	16	22	9	16	22	9	16	22
新洋 37 Xinyang 37	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
新洋 45 Xinyang 45	-	+	+++	-	-	-	-	-	-
新疆 FF ₁ Xinjiang FF ₁	+	+	++	-	-	-	-	-	-
云南 F ₁ Yunnan F ₁	+	+	+	-	-	-	-	-	-
南通 Nantong	+	+	+	-	-	-	-	-	-
高密 Gaomi	-	-	++	-	-	-	-	-	-
东辛 Dongxin	+	+	+	-	-	-	-	-	-
陕西 F ₂ Shanxi F ₂	-	-	++	-	-	-	-	-	-
枝江 2 Zhijiang 2	+	++	+++	-	-	-	-	-	-

注: + 个别形成 ++ 少量形成 +++ 大量形成 - 未形成
+ scarce ++ frequent +++ abundant - none

从表 3 可以看出,在含水量为 25%、通气良好的土壤中,不同地区的尖镰孢萎蔫专化型菌株都能形成数量不等的厚垣孢子,而在土壤含水量为 25%,置于无氧条件下培育者与在渍水土壤培育的结果相同,始终未见有厚垣孢子形成。

在充以大量 CO₂ (占气体组成 80% 以上),或充以氮气的无氧条件下,尖镰孢萎蔫专化型厚垣孢子的形成都受到抑制,却不妨碍其萌发,但也不能再继续发育并形成新的厚垣孢子(表 4, 5),与在上述渍水的土壤中所得结果相同。虽然在前两个处理中观察到对小孢子的形成和萌发有刺激作用,但它们的存活时间不长。由不同气体及渍水对土壤中厚垣孢子存活的影响(图 3)的结果来看,在 40 天时,无氧处理的土中菌量下降至试验开始时菌量的 1%,而高浓度 CO₂ 处理的土中菌量为初始菌量的 24%,接近有氧对照土中的菌量(23.8%)。在 80 天时,无氧处理的土中只分离到极个别的菌,而高浓度 CO₂ 处理的土中菌量尚为初始菌量的 1%,因而我们认为,就该菌在土壤中的存活而言,无氧的影响大于高浓度 CO₂ 的影响,何况在田间情况下,水稻土中 CO₂ 含量往往 < 9%^[4],远较试验处理中者为低,这样低的 CO₂ 含量不至于对该菌的存活产生明显的毒害作用,渍水条件下土壤中不利于该菌存活的主要原因是缺氧。

从上述试验结果看来,由于渍水造成的土壤环境是不利于该菌的生存的,即使是抗逆性较强的厚垣孢子在渍水条件下的土壤中存活时间也不长,从而导致了土壤中菌量不断下降,因此采用稻棉轮作的办法对防治棉花枯萎病有一定的防效,但由于土壤中总有部分

表 4 不同气体对厚垣孢子形成的影响 (江苏江浦棉场马肝土)

Table 4 Effect of air, nitrogen, carbon dioxide and water-logged soil condition on the formation of chlamydospore of *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*

培养时间 (天) Incubation time (Days)	处 理 Treatments		CO ₂	N ₂	CK (Air)	渍 水 Water-logging
7	灭菌土 Sterilized soils	贴土表 On the surface of soil	-	-	+++	*
		埋土内 Buried in soil	-	-	+++	*
	不灭菌土 Unsterilized soils	贴土表 On the surface of soil	-	-	+++	*
		埋土内 Buried in soil	-	-	+++	-
14	灭菌土 Sterilized soils	贴土表 On the surface of soil	-	-	+++	*
		埋土内 Buried in soil	-	-	+++	*
	不灭菌土 Unsterilized soils	贴土表 On the surface of soil	-	-	+++	*
		埋土内 Buried in soil	-	-	+++	-
28	灭菌土 Sterilized soils	贴土表 On the surface of soil	-	-	+++	*
		埋土内 Buried in soil	-	-	+++	*
	不灭菌土 Unsterilized soils	贴土表 On the surface of soil	-	-	+++	*
		埋土内 Buried in soil	-	-	+++	-

注: - 未形成 none +++ 大量形成 abundant * 未做 not determined.

表 5 不同气体对厚垣孢子发芽的影响 (江苏南通滨海盐土)

Table 5 Effect of air, nitrogen and carbon dioxide on germination of chlamydospores of *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (%)

培 养 时 间 (小时) Incubation time (Hours)	CO ₂	N ₂	CK (Air)
8	13.4	55.7**	17.2
16	20.9	33.5*	18.1
24	15.4	46.4	22.0
48	31.6*	49.0*	15.8

注 * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$.

厚垣孢子未能萌发,这些少量存活的厚垣孢子很可能就是以后病害再发展的感染源,这也正是稻棉轮作防病不彻底的重要原因。

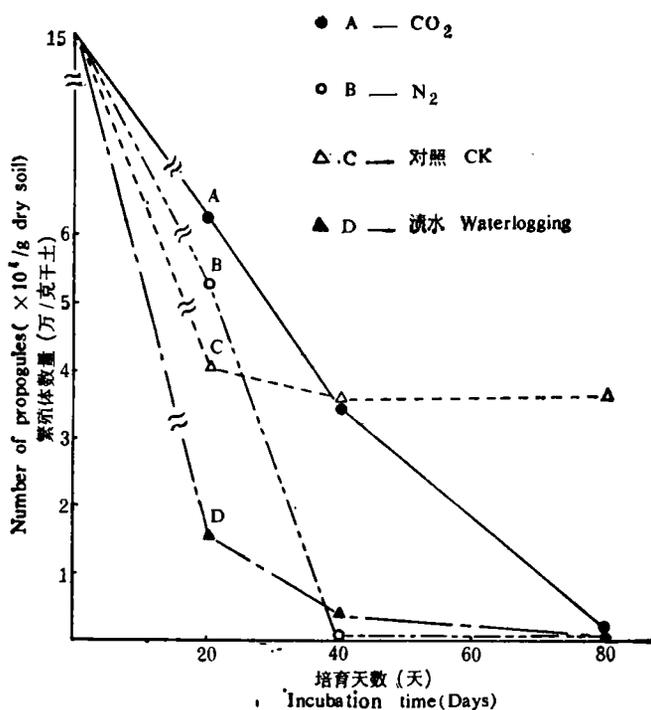


图 3 不同气体及渍水对厚垣孢子在土壤中存活的影响

Fig. 3 Effect of air, nitrogen, carbon dioxide and waterlogging on survival of chlamydozoospores of *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in soil

参 考 文 献

- [1] 中国科学院南京土壤研究所主编, 1978: 中国土壤. 第 226 页, 科学出版社。
- [2] Armstrong, G. M. and Armstrong, I. K., 1948: Nonsusceptible hosts as carriers of wilts *Fusarium*. *Phytopathology*, 38: 808—826.
- [3] Nash, S. M., et al., 1961: Existence of *Fusarium solani* f. *phaseali* as chlamydozoospores in soil. *Phytopathology*, 51: 308—312.
- [4] Newcombe, M., 1960: Some effects of water and anaerobic conditions on *Fusarium oxysporum* f. *cubense* in soil. *Transactions of the British Mycological Society*, 43: 51—59.
- [5] Tousson, T. A. and Snyder, W. C., 1961: Germination of chlamydozoospores of *Fusarium solani* f. sp. *phaseali* in soil. *Phytopathology*, 51: 620—630.
- [6] Smith, S. N. and Snyder, W. C., 1975: Persistence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in fields in the absence of cotton. *Phytopathology*, 65: 190—196.
- [7] Stover, R. H., 1953: The effect of soil moisture on *Fusarium* species. *Canadian journal of botany* 31: 693—697.
- [8] Stover, R. H., 1955: Flood-fallowing for eradication of *Fusarium oxysporum* f. *cubense* III Effect of oxygen on Fungi survival. *Soil Science*, 80: 397—412.
- [9] Stover, R. H., 1979: Flooding of soil for disease control In: *Soil disinfection* (D. Mulder, ed.), 19—28, Amsterdam-Oxford-New York.

THE EXISTENCE AND FLUCTUATION OF *F. OXYSPORUM F. SP. VASINFECTUM* IN SOIL

Dai Li-li, Gu Xi-xian, Lin Xian-gui and Hao Wen-ying

(*Institute of Soil Science, Academia Sinica, Nanjing*)

Summary

The existence of *F. oxysporum f. sp. vasinfectum* in relation to the fluctuation of propagules in soil under different edaphic conditions was studied in vitro. It was shown that the chlamydospores of this fungus were easily formed in upland field. But under waterlogged soil condition, formation of chlamydospores was inhibited because of the lack of oxygen and the toxicity of CO₂. The germinated chlamydospores were capable of making further propagation under well aerated soil condition. However, in submerged soils, the germlings were easily suffered from bacteriolysis in soil in a few days. As a result, propagules decreased gradually. Part of the ungerminated chlamydospores persisted in soil for a long time under submerged soil condition. Some of them can even survive more than 160 days. It is inferred that those chlamydospores still remained in soil might be one of the most important causative agents of reinfection, and it may be the reason that this fungus can not be eliminated and the wilt disease of cotton can not be completely controlled under rice-cotton rotation.